

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Petra VIDALI

**SESTAVA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB EVROPSKIH  
IN AMERIŠKIH GORSKIH LEDENIKOV**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Petra VIDALI

**SESTAVA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB EVROPSKIH IN  
AMERIŠKIH GORSKIH LEDENIKOV**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**BACTERIAL COMMUNITY COMPOSITIONS OF EUROPEAN  
AND AMERICAN ALPINE GLACIERS**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Martino Turk in za recenzenta prof. dr. Blaža Stresa.

Mentorica: doc. dr. Martina Turk

Recenzent: prof. dr. Blaž Stres

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Martina TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Blaž STRES  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravice shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Petra Vidali

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2  
DK UDK 579.24/26:577.2.083(043)=163.6  
KG ekologija mikroorganizmov/gorski ledeniki/bakterijske združbe/psihrofili/psihrotrofi/odpornost proti antibiotikom/molekularne metode/16S rRNA/*Janthinobacterium*  
AV VIDALI, Petra, dipl. biol. (UN)  
SA TURK, Martina (mentorica)/STRES, Blaž (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij Mikrobiologije  
LI 2016  
IN SESTAVA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB EVROPSKIH IN AMERIŠKIH GORSKIH LEDENIKOV  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)  
OP XII, 62 str., 2 pregl., 21 sl., 2 pril., 94 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Zaradi globalnega segrevanja se tako polarni kot visokogorski ledeniki že več desetletij pospešeno talijo. S tem izginja okolje v katerem živijo mikrobne združbe, ki so se tisočletja razvijale v relativno stabilnih razmerah (nizke temperature, visok hidrostatični in osmotski pritisk in malo hrani). Čeprav trenutno potekajo številne raziskave ledeniških mikroorganizmov, je le malo znanega o tveganjih, ki jih prinaša njihovo sproščanje v okolje. Skoraj nič ne vemo o nevarnostih, ki jih predstavljajo za rastline, živali ter tudi ljudi, na račun razširjanja morebitnih patogenov in genov za virulentne dejavnike (na primer odpornost proti antibiotikom). Iz vzorcev ledu in vode ledenikov Grinnell (Montana, ZDA) in Rhone (Valais, Švica) smo na različnih gojiščih in temperaturah inkubacije (4 °C, 15 °C in 30 °C) izolirali 278 bakterijskih sevov. Izolate smo identificirali na osnovi nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNA, ter jih fiziološko okarakterizirali. Določili smo njihove kardinalne temperature rasti in odpornost izbranih sevov proti različnim skupinam antibiotikov. V nadaljevanju smo se osredotočili predvsem na izbrane seve iz rodu *Janthinobacterium*, pri katerih smo proučevali prisotnost signalnih molekul za medcelično sporazumevanje, absorpcijske spektre pigmentov ter razgradnjo različnih sladkorjev. Ugotovili smo, da se mikrobne združbe aerobnih kemoheterotrofnih bakterij obeh ledenikov razlikujejo in da večina izolatov spada med psihrofile in psihrotrofe. Veliko izolatov je tudi odpornih proti antibiotikom, kljub temu, da so ledeniške bakterije v izoliranem okolju, kjer je selekcijski pritisk zaradi onesnaženja z antibiotiki minimalen.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2  
DC UDC 579.24/26:577.2.083(043)=163.6  
CX ecology of microorganisms/alpine glaciers/bacterial communities/psychrophiles/psychrotrophs/resistance to antibiotics/molecular methods/16S rRNA/*Janthinobacterium*  
AU VIDALI, Petra  
AA TURK, Martina (supervisor)/STRES, Blaž (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
PY 2016  
TI BACTERIAL COMMUNITY COMPOSITIONS OF EUROPEAN AND AMERICAN ALPINE GLACIERS  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)  
NO XII, 62 p., 2 tab., 21 fig., 2 ann., 94 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Due to global warming, polar and high mountain glaciers have been melting rapidly for several decades. This has led to disappearing of a certain environment, where bacterial communities have been evolving for millions of years in relatively stable conditions (low temperatures, high hydrostatic and osmotic pressure and low concentrations of nutrients). Despite numerous ongoing studies of glacier microorganisms very little is known about the risks of their release in the environment. Not much is known about the threats they represent to plants, animals and humans as well, due to their dissemination as potential pathogens and of genes that encode virulence factors (for instance, antibiotic resistance). Using various culture media and incubation temperatures (4 °C, 15 °C and 30 °C), we isolated 278 bacterial strains from ice and water samples of Grinnell (Montana, USA) and Rhone glaciers (Valais, Switzerland). The isolates were identified by 16S rRNA gene sequence analysis and then also physiologically characterised. The cardinal growth temperatures and antibiotic resistance of the chosen strains against different groups of antibiotics were determined. Then we set our focus particularly on the chosen strains of the genus *Janthinobacterium*. We examined the presence of quorum-sensing signal molecules, the absorption spectra of pigments and the degradation of various sugars. We discovered that bacterial communities of aerobic chemoheterotrophic bacteria of both glaciers are different. Most of the isolates can be classified as psychrophiles and psychrotrophs. Many of these isolates are also resistant to antibiotics, despite the fact that glacier bacteria are located in an isolated environment, where selection pressure of antibiotic pollution is minimal.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
 <b>1 UVOD .....</b>	 <b>1</b>
 <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	 <b>2</b>
2.1 LEDENIKI.....	2
<b>2.1.1 Ledeniki kot skrajnostno okolje .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Globalno segrevanje in umikanje ledenikov .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Ledenika Grinnell in Rhone.....</b>	<b>3</b>
2.2 BAKTERIJE V LEDENIKIH.....	5
<b>2.2.1 Psihrofilni in psihrotrofni .....</b>	<b>5</b>
2.2.1.1 Rod <i>Janthinobacterium</i> .....	6
2.2.1.2 Rod <i>Duganella</i> .....	7
<b>2.2.2 Uporabnost psihrofilov .....</b>	<b>8</b>
2.3 ODPORNOST PSIHROFILNIH/PSIHROTROFNIH BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM .....	8
 <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	 <b>11</b>
3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ .....	11
<b>3.1.1 Hrnilni agar (HA).....</b>	<b>11</b>
3.1.1.1 Hrnilni agar z dodanimi antibiotiki.....	11
<b>3.1.2 Gojišče Reasonerjev 2A agar (R2A).....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.3 Trdno minimalno gojišče M9 .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.4 Trdna gojišča s cikloheksimidom .....</b>	<b>14</b>

<b>3.1.5 Gojišče API 50 CHB/E .....</b>	<b>14</b>
3.3 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VZORCEV LEDU IN VODE LEDENIKOV .....	16
3.4 IZOLACIJA DNA IN POMNOŽITEV GENA ZA 16S rRNA.....	19
3.5 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA .....	20
<b>3.5.1 50-kratni Tris acetatni EDTA pufer (pufer TAE).....</b>	<b>20</b>
<b>3.5.2 6-kratni nanašalni pufer z barvilkom Orange G.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5.3 Izvedba agarozne gelske elektroforeze .....</b>	<b>20</b>
3.6 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ .....	21
<b>3.6.1 Sekvenciranje gena za 16S rRNA in identifikacija bakterijskih izolatov</b>	<b>21</b>
<b>3.6.2 Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNA izolatov rodov <i>Janthinobacterium</i> in <i>Duganella</i>.....</b>	<b>21</b>
3.7 UGOTAVLJANJE ODPORNOSTI BAKTERIJSKIH IZOLATOV PROTI SKUPINAM ANTIBIOTIKOV.....	21
3.8 UGOTAVLJANJE MINIMALNE IN MAKSIMALNE RASTNE TEMPERATURE IZOLATOV .....	22
3.9 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI PRODUKCIJE N-ACIL HOMOSERIN LAKTONOV PRI IZOLATIH IZ RODOV <i>Janthinobacterium</i> IN <i>Duganella</i> Z INDIKATORSKIM SEVOM <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 .....	22
3.10 PRIMERJAVA ABSORPCIJSKIH SPEKTROV PIGMENTOV PRI IZOLATIH IZ RODOV <i>Janthinobacterium</i> IN <i>Duganella</i> .....	22
3.11 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI RAZGRADNJE SLADKORJEV PRI IZOLATIH IZ RODOV <i>Janthinobacterium</i> S TESTOM API 50 CH (BioMerieux) .....	23
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
4.1. IZOLACIJA BAKTERIJ IZ LEDENIKOV .....	24
4.2 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJ .....	27
4.3 ODPORNOST BAKTERIJSKIH IZOLATOV PROTI RAZLIČNIM ANTIBIOTIKOM .....	32
4.4 FIZIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV GLEDE NA NJIHOV TEMPERATURNI RAZPON RASTI.....	34
4.5 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI PRODUKCIJE N-ACIL HOMOSERIN LAKTONOV PRI IZOLATIH IZ RODOV <i>Janthinobacterium</i> IN <i>Duganella</i> Z INDIKATORSKIM SEVOM <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 .....	35

4.6 PRIMERJAVA ABSORPCIJSKIH SPEKTROV PIGMENTOV PRI IZOLATIH IZ RODOV <i>Janthinobacterium</i> IN <i>Duganella</i> .....	36
4.7 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI RAZGRADNJE SLADKORJEV PRI IZOLATIH IZ RODOV <i>Janthinobacterium</i> S TESTOM API 50 CH (BioMerieux) .....	39
4.8 FILOGENETSKA ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ GENA ZA 16S rRNA IZOLATOV RODU <i>Janthinobacterium</i> .....	44
 <b>5 RAZPRAVA</b> .....	 <b>46</b>
<b>6 SKLEPI</b> .....	<b>51</b>
<b>7 POVZETEK</b> .....	<b>52</b>
<b>8 VIRI</b> .....	<b>53</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Antibiotiki, njihove koncentracije v gojišču in založne koncentracije.	.12
<b>Preglednica 2:</b> Rezultati testa API 50 CH (BioMerieux).	.....40

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Ledenik Grinnell (Foto: Turk M., 2013) .....	4
<b>Slika 2:</b> Ledenik Rhone (Foto: Sonjak S., 2013) .....	4
<b>Slika 3:</b> Ledenik Grinnell; mesto odvzema vzorcev, vzorca ledu GL1 in GL2 te mesto odvzema vzorca vode GV (Foto: Turk M., 2013).....	17
<b>Slika 4:</b> Ledenik Rhone; mesto odvzema in vzorci ledu RL1, RL2 in RL3 iz notranjosti ledenika, mesto odvzema vzorca vode RV in mesto odvzema vzorcev ledu Rzg in Rsp na zunanjem delu ledenika (Foto: Sonjak S., 2013).	18
<b>Slika 5:</b> Rast bakterij po nacepljanju 0,1 ml vzorca ledu iz ledenika Grinnell (GL2) na različna gojišča s cikloheksimidom (HA, R2A in M9) pri temperaturah 30 °C (inkubacija 6 dni), 15 °C (inkubacija 6 dni) in 4 °C (inkubacija 17 dni). ....	25
<b>Slika 6:</b> Število kolonijskih enot gojljivih aerobnih heterotrofnih bakterij na ml vzorca (CFU/ ml), ki so zrasle iz različnih vzorcev pri različnih gojiščih in temperaturah inkubacije .....	26
<b>Slika 7:</b> Ocenjeni deleži identificiranih gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij v ledeniku Grinnell. ....	28
<b>Slika 8:</b> Ocenjeni deleži identificiranih gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij v ledeniku Rhone. ....	29
<b>Slika 9:</b> Bakterijska sestava zunanjega ledu in ledeniške vode v ledeniku Grinnell. ...	30
<b>Slika 10:</b> Bakterijska sestava notranjega in zunanjega ledu ter ledeniške vode v ledeniku Rhone. ....	31
<b>Slika 11:</b> Deleži izoliranih sevov iz ledenikov Grinnell in Rhone, ki so odporni proti testiranim antibiotikom.....	33
<b>Slika 12:</b> Primer odpornosti proti antibiotikom izbranih sevov vrste <i>Flavobacterium</i> sp.. ....	33
<b>Slika 13:</b> Deleži izoliranih sevov iz ledenikov Grinnell in Rhone, ki glede na temperaturni razpon rasti spadajo med psihofile, psihrotrofe in mezofile....	34
<b>Slika 14:</b> Primer rasti izbranih sevov <i>Janthinobacterium</i> sp., <i>Duganella</i> sp. in <i>Rugamonas rubra</i> , pri različnih temperaturah.....	35
<b>Slika 15:</b> Ugotavljanje sposobnosti produkcije homoserin laktonov z indikatorskim sevom <i>Chromobacterium violaceum</i> . ....	36
<b>Slika 16:</b> Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu <i>Janthinobacterium</i> (L-1392, L-1412, L-1412, L-1427 in L-1535, ki ni tvoril pigmentov), ekstrahiranih s 96-odstotnim etanolom. ....	37
<b>Slika 17:</b> Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu <i>Janthinobacterium</i> (L-1392, L-1412, L-1412, L-1427 in L-1535, ki ni tvoril pigmentov), ekstrahiranih z 10-odstotno H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> razredčeno v 96-odstotnem etanolu. ....	37
<b>Slika 18:</b> Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu <i>Duganella</i> (L-1405, L-1408), ekstrahiranih s 96-odstotnim etanolom. ....	38

<b>Slika 19:</b> Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu <i>Duganella</i> (L-1405, L-1408), ekstrahiranih z 10-odstotno H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> razredčeno v 96-odstotnem etanolu.	38
<b>Slika 20:</b> Primer testa API50 (BioMerieux)	39
<b>Slika 21:</b> Filogenetsko drevo preučevanih izolatov rodu <i>Janthinobacterium</i> in <i>Duganella</i> .	45

## KAZALO PRILOG

**Priloga A1:** Seznam izoliranih sevov iz ledenika Grinnell ter njihovo ocenjeno skupno število pri vseh temperaturah in gojiščih.

**Priloga A2:** Seznam izoliranih sevov iz ledenika Rhone ter njihovo ocenjeno skupno število pri vseh temperaturah in gojiščih.

**Priloga B1:** Testirani izolati iz ledenika Grinnell, njihov temperaturni razpon rasti ter odpornost proti izbranim antibiotikom.

**Priloga B2:** Testirani izolati iz ledenika Rhone, njihov temperaturni razpon rasti ter odpornost proti izbranim antibiotikom.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp	ampicilin
Ch	kloramfenikol
Cip	ciprofloksacin
Ctx	cefotaksim
Er	eritromicin
Ert	ertapenem
GL1	ledenik Grnnell, vzorec ledu 1 (več vključkov)
GL2	ledenik Grinnell, vzorec ledu 2 (manj vključkov)
GV	ledenik Grinnell, vzorec vode iz ledeniškega jezera
HA	hranilni agar
Imp	imipenem
<i>J. agaricidamnosum</i>	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>
<i>J. lividum</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>
<i>J. svalbardensis</i>	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>
Kn	kanamicin
M9	trdno minimalno gojišče M9
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
RL1	ledenik Rhone, vzorec ledu 1 iz notranjosti ledenika
RL2	ledenik Rhone, vzorec ledu 2 iz notranjosti ledenika
RL3	ledenik Rhone, vzorec ledu 3 iz notranjosti ledenika
Rsp	ledenik Rhone, vzorec ledu iz spodnjega zunanjega dela ledenika
RV	vzorec vode iz notranjosti ledenika
Rzg	ledenik Rhone, vzorec ledu iz zgornjega zunanjega dela ledenika
R2A	gojišče Reasonerjev 2A agar
TC	tetraciklin

## 1 UVOD

Ledeniki predstavljajo ekstremno okolje s temperaturami, ki so ves čas pod lediščem. Tu so se tekom tisočletij razvijale specializirane biotske združbe (Rothschild in Mancinelli, 2001; Miteva, 2008) v katerih prevladujejo psihrofili in psihrotrofi. Ti so razvili vrsto prilagoditev, zaradi katerih so sposobni preživeti in se razmnoževati v tako neugodnem okolju za življenje. Na račun edinstvenih prilagoditev so potencialno uporabni v biotehnologiji, industriji, medicini in bioremediaciji (Gerday in sod., 2000; Asencio in sod., 2014). Zaradi globalnega segrevanja in posledično taljenja ledenikov, pa tudi mikroorganizmi prehajajo v okolje. Kakšen vpliv imajo na ostala živa bitja je znanega zelo malo. V zadnjem času je več raziskav, ki se osredotočajo predvsem na proučevanje odpornosti ledeniških bakterij proti različnim antibiotikom. Pokazalo se je namreč, da je stopnja odpornosti proti antibiotikom v ledenikih zelo visoka, kljub izoliranosti in minimalnemu selekcijskemu pritisku zaradi uporabe antibiotikov (Segawa in sod., 2013). Širjenje genov za odpornost proti antibiotikom bi lahko predstavljalo velik problem tako za ljudi, kot tudi za rastline in živali.

Cilj naše naloge je bil izolacija in identifikacija bakterij iz vzorcev ledu in vode ledenikov Grinnell (Montana, ZDA) in Rhone (Valais, Švica). Posamični ledeniki lahko predstavljajo izolirano okolje v katerem se bakterijske združbe razvijajo večinoma neodvisno od okolice. Predpostavili smo, da se bodo bakterijske združbe oben ledenikov med seboj razlikovale, saj sta ledenika geografsko zelo oddaljena. Proučevali smo tudi odpornost izolatov proti izbranim antibiotikom (ampicilin, tetraciklin, imipenem, ertapenem, eritromicin, kloramfenikol, kanamicin, ciprofloksacin in cefotaksim). V več študijah so dokazali, da so bakterije iz ledenikov odporne proti različnim antibiotikom (Ball in sod., 2014), kar smo pričakovali tudi v našem poskušu. Izolate smo nato fiziološko okarakterizirali glede na temperturni razpon rasti. Zaradi nizkih temperatur v ledenikih smo pričakovali, da bodo izolati večinoma spadali med psihrofile in psihrotrofe. V nadaljevanju smo se osredotočili predvsem na izbrane seve iz rodu *Janthinobacterium*, za katere smo predvidevali, da niso iste vrste. Pri njih smo proučevali prisotnost signalnih molekul za celično sporazumevanje (quorum sensing), absorpcijske spektre pigmentov, ki jih producirajo, razgradnjo različnih sladkorjev, ter naredili filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij gena za 16S rRNA.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 LEDENIKI

Ledeniki so velike gmote trajnega ledu na kopnem (Post in sod., 2000), nastale iz sveže zapadlega snega. Ta se nalaga na starejše plasti, ki se niso stopile tekom prejšnjih let. Ledeniki nastajajo na območjih, kjer so poletne temperature dovolj nizke, da se zapadli sneg ne stopi v celoti oziroma na območjih, kjer akumulacija preseže topljenje in izgubo mase na druge načine (npr. evaporacija). Plast snega tako postaja debelejša in posledično težja, zaradi česar se v spodnjih delih začne proces rekristalizacije. V končni fazi spremjanja snega nastane ledeniški led (Andreassen in sod., 2012).

Ledenike delimo na gorske ledenike, ledene pokrove ter ledene odeje. Slednje obsegajo več kot 50.000 km<sup>2</sup> in prekrivajo večino Antarktike in Grenlandije. Glede na temperaturo ledenike razvrščamo med zmerne, politermalne in hladne. Led v zmernih ledenikih je tako imenovan moker led, saj je ves čas na točki taljenja zaradi pritiska, izjema je zgornja plast ledenika, kjer je vpliv sezonskega ohlajanja. Led v hladnih ledenikih je pod točko taljenja, zaradi česar ni nikjer v ledeniku prisotne tekoče vode. Politermalni ledeniki pa imajo zmerne in hladne dele (Andreassen in sod., 2012).

Gorski ledeniki zaradi lastne teže drsijo proti nižji nadmorski višini, proti območju z višjo temperaturo, kar povzroči taljenje ledu. Manjšanje in večanje ledenikov na letni ravni (letna masna bilanca) je odvisno od letne akumulacije in ablacie. Akumulacija vključuje vse procese, ki prispevajo k masi ledenika, glavni med njimi so snežne padavine. Ablacija združuje procese, ki zmanjšujejo maso ledenika, glavna med njimi sta taljenje in lomljene večjih blokov ledu. Do slednjega prihaja zlasti pri ledenikih, katerih konci se končajo v ledeniških jezerih ali morju (Andreassen in sod., 2012).

Ledeniški led je edinstven ekosistem, ki kronološko ohranja mikrobno življenje in klimatske spremembe skozi čas. Večino ledu, ki prekriva 10 odstotkov zemeljske kopenske površine, predstavljajo ledene odeje na Grenlandiji in Antarktiki. Hkrati predstavljajo tudi 77 odstotkov sladke vode na zemlji (Cuffey in Paterson, 2010). Ledeniki prekrivajo skoraj 16.000 km<sup>2</sup> površine (Priscu in sod., 2006), v globino merijo med nekaj 100 m do 4 km. Temperatura v ledeniku z globino narašča, na primer na južnem polu imajo ledeniki na površini približno -50 °C in približno -6 °C do -10 °C v najglobljih slojih (Price in sod., 2002).

Tudi gorski ledeniki so dobri pokazatelji dolgoročnih podnebnih sprememb, saj svojo maso in velikost spreminja glede na desetletne tendence temperature in padavin. Tako lahko globalno zmanjševanje gorskih ledenikov povezujemo s podnebnimi

spremembami daljšega časovnega obdobja, saj se ne odzivajo na letna odstopanja od teh (Hall in Fagre, 2003).

### **2.1.1 Ledeniki kot skrajnostno okolje**

Organizme, ki so sposobni preživeti v skrajnostnih (ekstremnih) okoljih, imenujemo ekstremofili. Ledeniki predstavljajo ekstremno okolje in le malo organizmov je dovolj prilagojenih na življenje v njih. Temperature v ledenikih so ves čas pod lediščem kar pomeni, da je voda v trdni obliki in zato nedostopna živim bitjem, poleg tega lahko ledeni kristali ob nastanku poškodujejo strukturo celic (Rothschild in Mancinelli, 2001). Zaradi prisotnih topljencev, ki preprečujejo zamrznitev vode, v ledeniskem ledu obstaja mreža kanalčkov s tekočo vodo, ki omogoča oskrbo mikroorganizmov s hranili in vodo (Price in Sowres, 2004). Ti kanalčki in tanek sloj vodnega filma na površini mineralnih delcev predstavljajo dva tipa habitatov, ki obstajata v ledenikih (Price, 2007). Ledeniški led predstavlja okolje z malo hranili (Simon in sod., 2009). Večina organskih snovi izvira iz oddaljenih območij, od koder so jih prinesle zračne mase (Stibal in sod., 2008). Ker je v ledenikih večina vode v obliki ledu, je v preostali tekoči vodi povišana koncentracija topljencev. Zaradi tega je povečan osmotski pritisk v predelu s tekočo vodo, ki postane hipertonična raztopina celicam (Mazur, 1963; Muldrew in McGann, 1990). V globljih predelih ledenikov so zaradi debele plasti ledu visoki hidrostatični pritiski. Pritiskajo na celice in vplivajo na tesnejše pakiranje lipidov, kar se odraža v zmanjšani fluidnosti membran (Rothschild in Mancinelli, 2001). Mikroorganizmi so v ledenikih tudi velikokrat izpostavljeni močni vidni svetlobi in UV sevanju (Miteva, 2008).

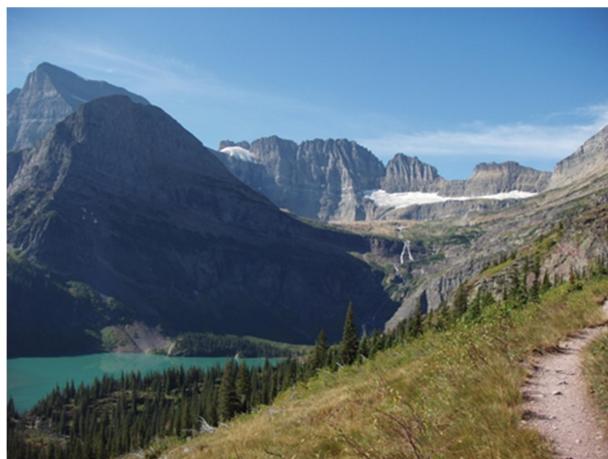
### **2.1.2 Globalno segrevanje in umikanje ledenikov**

Globalno segrevanje pomeni višanje povprečne temperature zemeljskega ozračja, glavni vzrok predstavlja povečanje koncentracij toplogrednih plinov v atmosferi (Lashof in sod., 1990). Zaradi globalnega segrevanja se tako polarni kot visokogorski ledeniki pospešeno talijo, kar je eden izmed glavnih vzrokov za dvigovanje ravni morja (Church, 2001, cit. po Raper in Braithwaite, 2006). Taljenje ledenikov ima lahko tudi hude posledice za človeštvo, saj približno 50 odstotkov sladke vode, ki jo letno porabimo, dobimo iz gorskih ledenikov (Liniger in sod., 1998, cit. po Hall in Fagre, 2003).

### **2.1.3 Ledenika Grinnell in Rhone**

Grinnell in Rhone sta primera gorskih, politermalnih ledenikov. Nahajata se v Severni Ameriki (Grinnell) oziroma v Evropi (Rhone), v območju zmernega pasu.

Ledenik Grinnell se nahaja v narodnem parku Glacier National Park v Montani (ZDA). V času male ledene dobe so se v Severni Ameriki, kjer se nahaja tudi ledenik Grinnell, obstoječi ledeniki večali in nastajali so novi (Grove 1988, cit. po Hall in Fagre 2003). Med leti 1910 in 1980 se je lokalna povprečna poletna temperatura dvignila za približno 1,7 °C, kar je povzročilo hitro taljenje ledenikov. Večina manjših ledenikov na tem območju je popolnoma izginila, večji pa so se močno zmanjšali (Hall in Fagre, 2003), med njimi tudi Grinnell. Pod ledenikom je po letu 1930 nastalo ledeniško jezero, imenovano Upper Grinnell Lake (Key in sod., 2002). Vzorci, uporabljeni v nalogi, so bili odvzeti s plavajočih kosov ledu v jezeru, odlomljenih iz ledenika ter iz omenjenega jezera.



Slika 1: Ledenik Grinnell (Foto: Turk M., 2013)



Slika 2: Ledenik Rhone (Foto: Sonjak S., 2013)

Ledenik Rhone (Ronski ledenik) se nahaja v Urnskih Alpah v kantonu Valais (Švica), iz njega izvira tudi istoimenska reka Rona. Je eden izmed večjih ledenikov v švicarskih Alpah in je bil velik del holocena, ki traja zadnjih 11.500 let, manjši kot danes (Goehring in sod., 2011). Vzorci, uporabljeni v nalogi, so bili odvzeti s površine spodnjega dela ledenika, ter iz notranjosti rova, ki je namenjen turističnemu ogledu in ga vsako leto izkopljejo v ledenik.

## 2.2 BAKTERIJE V LEDENIKIH

Največji delež zemeljske biosfere predstavljajo organizmi, ki uspevajo v hladnih okoljih, kot so ledeniki, ledene odeje in oceani (Siddiqui in Cavicchioli, 2006). Čeprav so hladna okolja neugodna za življenje, so uspešno poseljena s specializiranimi biotskimi združbami. Kljub negativnemu vplivu nizkih temperatur na biokemijske reakcije, ti mikroorganizmi rastejo, se delijo in premikajo podobno hitro kot sorodne vrste, ki živijo v toplejših okoljih. Razvili so namreč vrsto prilagoditev, kot so spremembe v strukturi membran, proteinov in encimov, s katerimi uspešno kljubujejo neugodnim razmeram v ledenikih (Gerday in sod., 2000). Najpomembnejša je prilagoditev encimov, pri katerih je prišlo do razvoja številnih strukturnih lastnosti, ki omogočajo višjo fleksibilnost v primerjavi s termostabilnimi homologi. Visoka fleksibilnost, predvsem v okolini aktivnega mesta, povzroči nizko aktivacijsko entalpijo, nizko substratno afiniteto in visoko specifično aktivnost pri nizkih temperaturah. Posledica visoke fleksibilnosti je zmanjšana stabilnost encima, ki se kaže predvsem v nestabilnosti pri višjih in redkeje tudi pri nižjih temperaturah (Siddiqui in Cavicchioli, 2006). Številni psihrofili in psihrotrofi se zaščitijo tudi s proteini hladnega šoka (ang. cold shock proteins) (Berry in Foegeding, 1997). Ker se z nižanjem temperature zmanjšuje tudi fluidnost membran, bakterije za preprečevanje prevelike rigidnosti v membrano vgrajujo več nenasičenih maščobnih kislin (Methe in sod., 2005). Na osmotski stres pa se odzovejo s kopiranjem neionskih ali kompatibilnih topljencev kot so na primer trehaloza, glicerol in manitol. Ti pomagajo pri uravnavanju osmotskega pritiska in ohranjanju funkcij proteinov znotraj celičnega (Beales, 2004).

### 2.2.1 Psihrofili in psihrotrofi

Organizme, prilagojene na življenje pri nizkih temperaturah, imenujemo psihrofili oziroma psihrotrofi. Pri psihrofilih je optimalna temperatura za rast 15 °C ali manj, maksimalna pod 20 °C, minimalna pa 0 °C ali manj. Najdemo jih v vseh trajno hladnih okoljih. So zelo občutljivi na višje temperature, nekatere uniči že temperatura okoli 20 °C (Morita, 1975). Za razliko od psihrofilov so psihrotrofni organizmi (psihrotolerantni) tudi sposobni rasti pri 0 °C, vendar je njihova rast pri tako nizki temperaturi zelo počasna. Njihova optimalna temperatura rasti je med 20 °C in 40 °C. So bolj razširjeni

kot psihrofili, najdemo jih namreč tudi na toplejših območjih (Madigan in sod., 2009). Psihrofili in psihrotrofi so razvili odpornost proti stresnim dejavnikom v okolju, kot so na primer dolgotrajna zamrznitev, izmenično zamrzovanje in taljenje, izsuševanje in sončna radiacija. Mnogo jih sintetizira pigmente (Miteva, 2008) in so velikokrat sposobni preživeti daljša obdobja v kriobiozi (Moyer in Morita, 2007).

V čistem ledu je število bakterijskih celic največkrat nizko ( $10^2$  -  $10^4$  ml $^{-1}$ ), na njihovo število vpliva predvsem prisotnost netopnih mineralnih delcev, ki nudijo bakterijam primerno površino za pritrditev (Abyzov in sod., 1998). V bazalnem ledu, na dnu ledenikov in ledenih odej, so koncentracije mikroorganizmov, mineralnih zrn, plinov, organskih in anorganskih ionov, bistveno višje (Price, 2007). Rast mikroorganizmov je precejšnja tudi na površju ledenikov, v kriokonitnih kotanjah, kjer je voda zaradi prisotnosti temnih organskih in anorganskih delcev in s tem zmanjšanega albedo učinka, v tekoči obliki (Takeuchi in sod., 2001; Margesin in sod., 2002).

Christner in sod. (2000) so iz ledenikov na Antarktiki, Grenlandiji, Kitajski in Južni Ameriki izolirali in identificirali bakterije iz rodov *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Friedmanniella*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Paenibacillus*, *Planococcus*, *Propionifera*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* in *Stenotrophomonas*. Liu in sod. (2009) so iz vzorcev ledu in snega iz ledenikov na Tibetanski planoti poleg večine omenjenih identificirali še vrste iz rodov *Acidovorax*, *Curvibacter*, *Hymenobacter*, *Ochrobactrum*, *Polaromonas*, *Pseudomonas* in *Ralstonia*. Sicer pa so najpogosteje identificirane bakterije iz ledenikov iz rodov *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Exiguobacterium*, *Frigoribacterium*, *Janthinobacterium*, *Methylobacterium*, *Rhodococcus* in *Sphingomonas* (Miteva, 2008).

### 2.2.1.1 Rod *Janthinobacterium*

Rod *Janthinobacterium* (Oxalobacteraceae, Betaproteobacteria) je prvi opisal Sneath leta 1984. So po Gramu negativne, ravne ali rahlo ukrivljene palčke. So striktni aerobi in ne tvorijo spor. So gibljive, saj imajo en polarni biček in od enega do štiri lateralne bičke. Pogosto jih najdemo v zemlji, jezerih, rekah in izvirih, vključno z območji permafrosta ter v ledenikih (Shivaji in sod., 1991, Garcia-Echauri in sod., 2011; Kim in sod., 2012). Do sedaj so bile opisane tri vrste iz rodu *Janthinobacterium*: *J. agaricidamnosum*, *J. lividum* in *J. svalbardensis*.

*Janthinobacterium agaricidamnosum* ne sintetizira pigmentov in je znan kot povzročitelj gnilobe pri glivi *Agaricus bisporus* (šampinjon) (Lincoln in sod., 1999; Graupner in sod., 2012). Izloča jagaricin, ki deluje kot antimikotik s potencialom za

zdravljenje določenih glivnih obolenj pri človeku. Deluje namreč proti pogostim človeškim patogenom, kot so *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus terreus* (Sanchez in Dorrestein, 2013).

Nekateri sevi *J. lividum* proizvajajo značilen, vijoličen pigment violacein, ki kolonije obarva temno vijolično (Kim in sod., 2012; Gillis in De Ley, 2006). To je nedifuzibilen pigment, derivat indola, ki nastane z oksidacijo triptofana. Spektrofotometrično ga preprosto zaznamo, saj ima raztopljen v etanolu absorpcijski maksimum pri 579 nm, v 10-odstotni žveplovi kislini, razredčeni v etanolu, pa spremeni barvo v zeleno in ima absorpcijski maksimum pri 700 nm (Johnson and Beer, 1971, cit. po Gillis in De Ley, 2006). Producija violaceina in nastanek biofilma je verjetno odgovor na okoljski stres (Pantanella in sod., 2006). Sintetizirajo  $\beta$ -laktamaze, zaradi katerih so odporni proti večim  $\beta$ -laktamskim antibiotikom (Rossolini in sod., 2001; Schloss in sod., 2010). Povzročajo kvar pasteriziranega mleka (Eneroth in sod., 2000) in občasno tudi oportunistične infekcije, kot je septikemija (Gillis in De Ley, 2006). Nekatere seve *J. lividum* najdemo kot simbionte na koži dvoživk, kjer onemogočajo okužbe s patogeno glivo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Brucker in sod., 2008).

Pred kratkim so odkrili novo vrsto in sicer *J. svalbardensis*. Sev JA-1 je bil izoliran iz ledeniškega ledu na otočju Svalbard (Norveška) in sintetizira violaceinu podoben pigment, ki obarva kolonije temno rdeče-rjavo ali črno. Ima samo en polarni biček in ne izloča signalnih molekul, homoserin laktonov, za medcelično sporazumevanje (Ambrožič Avguštin in sod., 2013). Bakterijsko sporazumevanje obsega sintezo, sproščanje, zaznavanje in odzivanje na majhne, hormonom podobne molekule, imenovane avtoinduktorji, ki bakterijam omogočajo zaznavanje okolja in spremljanje gostote bakterijske združbe. Z večanjem združbe postaja koncentracija signalnih molekul v okolini večja in ko preseže določen prag, se celice začnejo odzivati z ekspresijo določenih genov. Tako bakterije uskladijo odziv in delujejo kot celota (Waters in Bassler, 2005). Bakterije uporabljajo mehanizem medceličnega sporazumevanja za uravnavanje simbioze, virulence, kompeticije, sinteze antibiotikov, gibljivosti, sporulacije in nastanka biofilma (Miller in Bassler, 2001). Po Gramu pozitivne in negativne bakterije imajo različna mehanizma medceličnega sporazumevanja. Večina po Gramu negativnih bakterij sintetizira N-acil homoserin laktone (N-AHL), ki služijo kot signalne molekule (Salmond in sod., 1995).

### 2.2.1.2 Rod *Duganella*

Bakterije iz rodu *Duganella* (Oxalobacteraceae, Betaproteobacteria) so po Gramu negativne, kratke palčke. Imajo en polarni biček in so gibljive. So obligatni aerobi, kemoorganotrofi in ne tvorijo spor (Li in sod., 2004). Do sedaj je bilo opisanih 6 vrst, in sicer *D. nigrescens*, *D. phyllosphaerae*, *D. radicis*, *D. sacchari*, *D. violaceinigra* in

*D. zoogloeooides* (Madhaiyan in sod. 2013; Choi in sod., 2015). Najdemo jih v ledenikih in ledeniških jezerih (Huang in sod., 2010), na rastlinah (Kämpfer in sod. 2012), v rizosferi (Madhaiyan in sod. 2013) in tleh (Choi in sod., 2015). Nekateri sevi tvorijo pigment violacein in rumene pigmente (Li in sod., 2004; Choi in sod., 2015).

### **2.2.2 Uporabnost psihrofilov**

Biotehnološko so zanimivi predvsem encimi psihrofilov, ker so katalitično aktivni pri nizkih temperaturah in jih zlahka inaktiviramo z rahlim povečanjem temperature (Nichols in sod., 1999; Gerday in sod., 2000). Zmanjšane so tudi nezaželene kemijske reakcije, ki se pojavijo pri višjih temperaturah (Russell, 1998; Gerday in sod., 2000). Biotehnološki proces, ki poteka pri nizkih temperaturah, je energetsko varčnejši (ni potrebe po segrevanju), obstaja pa tudi manjša verjetnost kontaminacije z mezofili. Take encime uporabljajo v industriji detergentov, živilski industriji, tekstilni industriji in še kje (Gerday in sod., 2000).

Pomembna je tudi uporaba psihrofilov pri bioremediaciji (Simon in sod. 2009). Nafta in njeni produkti so eni izmed največjih onesnaževalcev različnih ekosistemov. Določeni psihrofili so sposobni razgradnje ogljikovodikov iz nafte, kar bi lahko uporabili za odstranjevanje le-te na območjih z nizkimi temperaturami, kjer je odstranjevanje še posebej težavno (Belousova in sod., 2002).

Zaradi vse večje razširjenosti odpornosti proti antibiotikom pri bakterijah potekajo številne raziskave, ki so usmerjene k iskanju novih snovi s protimikrobnou aktivnostjo. Psihrofili izločajo številne snovi, ki bi lahko predstavljale potencialno nov vir aktivnih spojin za obvladovanje mikroorganizmov, ki povzročajo okužbe pri ljudeh. Asencio in sod. (2014) so preizkušali protimikrobnodelovanje alkoholnega izvlečka iz Antarktike izolirane bakterije *Janthinobacterium* sp., seva SMN 33.6. Ugotovili so, da testirani sev vsebuje protibakterijske snovi, ki delujejo proti sevom *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* ter bi se lahko uporabile kot antibiotiki.

## **2.3 ODPORNOST PSIHROFILNIH/PSIHROTROFNIH BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM**

Antibiotiki so snovi, ki na bakterije delujejo bakteristatično ali baktericidno. So pogosti sekundarni metaboliti različnih bakterij in gliv. Delujejo lahko na več načinov: zavirajo sintezo celičnih proteinov, lipidov, folatov, celične stene, vplivajo na transkripcijo ter na strukturo in funkcijo citoplazemske membrane (Madigan in sod., 2009).

Zaradi baktericidnih lastnosti ter nizke toksičnosti za človeka so med najbolj široko uporabljenimi  $\beta$ -laktamski antibiotiki, kot so ampicilin, imipenem, ertapenem in cefotaksim s peptidoglikanom kot tarčo (Madigan in sod., 2009). Zaradi širokega spektra delovanja so zelo pomembni tudi tetraciklini, ki preprečujejo vezavo aminoacil-tRNA na vezavno mesto na ribosому (mesto A), s čimer zavirajo podaljševanje polipeptidne verige (Chopra in Roberts, 2001). Kanamicin uvrščamo med aminoglikozidne antibiotike. Z vezavo na ribosomsko podenoto 30S moti proces preverjanja vstavitve pravilne aminokisline v peptidno verigo, zaradi česar nastanejo nefunkcionalni proteini (Schroeder in sod., 2000). Eritromicin spada med makrolide, ki se vežejo na ribosomsko podenoto 30S in zaustavijo podaljševanje nastajajoče polipeptidne verige (Tenson in sod., 2003), poleg tega tudi zavirajo izdelavo novih ribosomskih podenot 50S (Champney, 2003). Kloramfenikol z vezavo na ribosomsko podenoto 50S zavira peptidil transferazo in s tem zavira nastanek peptidne vezi. (Thompson in sod., 2002). Kinoloni so sintetični, širokospektralni antibiotiki. Tiste, ki vsebujejo atom fluora, imenujemo fluorokinoloni. Sem uvrščamo tudi ciprofloxacin. Fluorokinoloni interagirajo z DNA-girazo, ki sodeluje pri podvajaju verige DNA in tako preprečijo superzvijanje DNA (Ruiz, 2003).

Danes zaradi široke uporabe antibiotikov predstavlja velik problem razvoj genov za odpornosti proti antibiotikom pri bakterijah, zaradi česar veliko antibiotikov ni več učinkovitih. Bakterije lahko razvijejo odpornost proti antibiotikom z različnimi mehanizmi. Mutacije lahko povzročijo spremembo tarčnega mesta, zaradi česar se antibiotik ne more vezati in učinkovati. Prav tako lahko nastanejo spremembe v prepustnosti celične stene, kar antibiotiku oteži vstop ali pa pride do odpornosti zaradi horizontalnega prenosa genov odpornosti (Andersson, 2003; Livermore, 2003).

Mikroorganizme, ki nosijo gene za odpornost proti antibiotikom, najdemo na primer v črevesni mikroflori ljudi in živali ter mikroflori tal kmetijskih površin, od koder se mikroorganizmi in geni za odpornosti lahko širijo v okolje z vodo in atmosferskim kroženjem (Levy in Marshall, 2004; Gibbs in sod., 2006). Možen je tudi prenos preko živali, predvsem s ptičjimi iztrebki (Sjölund in sod., 2008). V nedavnih raziskavah so zaznali prisotnost bakterij, odpornih proti antibiotikom v okoljih, ki so geografsko izolirana, kar bi lahko bil indikator človeškega vpliva na globalno okolje (Ushida in sod., 2010; Segawa in sod., 2013).

V več študijah so dokazali, da so bakterije izolirane iz ledenikov odporne proti različnim antibiotikom. Eden izmed razlogov bi lahko bil ta, da je večina mikroorganizmov prišla tja z zračnimi masami iz oddaljenih območijh, in se torej odpornosti niso razvile *in situ*. Zelo verjetno je vzrok tako obsežnih odpornosti tudi prenos plazmidov (Ball in sod., 2014). Različni geni z zapisom za odpornosti proti različnim antibiotikom se pogosto nahajajo na istem plazmidu, transpozonu ali

integrону, zaradi česar lahko sev, ki je plazmid prejel, postane odporen proti večim antibiotikom (Summers, 2002).

Večina današnjih ledenikov je nastala v času pleistocena, v obdobju ponavljajočih poledenitev (Ivy-Ochs in sod., 2009). Bakterije, ki so bile tisočletja ujete v ledu, tako s taljenjem ledenikov ponovno vstopajo v okolje. Nihče ne ve kakšne bi lahko bile posledice njihovega prehajanja v okolje, zaradi česar potekajo številne raziskave ledeniških mikroorganizmov. Potencialno tveganje predstavlja predvsem odpornost ledeniških bakterij na antibiotike ter širjenje genov odpornosti (Miteva in sod., 2004; Segawa in sod., 2013).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ

##### 3.1.1 Hrnilni agar (HA)

Sestavine za hrnilni agar:

8 g      hrnilna juha (Biolife)  
5 g      NaCl (Formedium)  
15 g     agar-agar (Formedium)  
do 1 l    destilirana voda

Sestavine za gojišče smo raztopili v vodi, pH uravnali z 1M NaOH na pH 7 in sterilizirali z avtoklavom 15 min pri 121 °C in 1,2 atm. Gojišče smo po ohlajanju v vodni kopeli pri 55 °C aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke.

###### 3.1.1.1 Hrnilni agar z dodanimi antibiotiki

Založne koncentracije antibiotikov smo pripravili tako, da smo ustrezno količino antibiotika v trdni obliki raztopili v ustrezni količini destilirane vode oziroma 96-odstotnem etanolu. Hrnilni agar smo naredili po zgoraj opisanem postopku, po ohlajanju v vodni kopeli pri 55 °C pa smo mu dodali založne koncentracije antibiotikov, kot je prikazano v preglednici na naslednji strani.

Preglednica 1: Antibiotiki, njihove koncentracije v gojišču in založne koncentracije.

Kratica antibiotika	Antibiotik in proizvajalec	Koncentracija v gojišču	Založna koncentracija	µl založne koncentracije/l gojišča
Amp	Ampicilin (Sigma)	50 mg/l	100 mg/ml dH <sub>2</sub> O	500
Tc	Tetraciklin (Sigma)	15 mg/l	12,5 mg/ml EtOH	1200
Imp	Imipenem (Sigma)	2 mg/l	5 mg/ml dH <sub>2</sub> O	400
Ert	Ertapenem (Sigma)	0,5 mg/l	50 mg/ml dH <sub>2</sub> O	10
Er	Eritromicin (Sigma)	15 mg/l	15 mg/ml v EtOH	1000
Ch	Kloramfenikol (Sigma)	25 mg/l	50 mg/ml v EtOH	500
Kn	Kanamicin (Roth)	20 mg/l	30 mg/ml dH <sub>2</sub> O	670
Cip	Ciprofloxacin (Fluka)	0,25 mg/l	1 mg/ml dH <sub>2</sub> O	250
Ctx	Cefotaksim (Sigma)	2 mg/l	10 mg/ml dH <sub>2</sub> O	200

### 3.1.2 Gojišče Reasonerjev 2A agar (R2A)

Sestavine za Reasonerjev 2A agar:

18,12 g gojišče R2A agar (Fluka)  
do 1 l destilirana voda

Gojišče R2A smo raztopili s kuhanjem pri 100 °C in ga nato sterilizirali z avtoklaviranjem. Po ohlajanju v vodni kopeli pri 55 °C smo gojišče aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke.

### 3.1.3 Trdno minimalno gojišče M9

Raztopina makroelementov za gojišče M9:

60 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)  
30 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)  
5 g NaCl (Formedium)  
10 g NH<sub>4</sub>Cl (Borka Šabac)  
do 1 l voda Milli-Q

Makroelemente smo raztopili v 900 ml vode Mili-Q, pH umerili na pH 7,4 z 1M NaOH in dopolnili z vodo Milli-Q do 1 litra. Sterilizirali smo z avtoklaviranjem.

1 M raztopina MgSO<sub>4</sub>:

12,04 g      MgSO<sub>4</sub> (Acros Organics)  
do 100 ml    voda Milli-Q

Raztopljen MgSO<sub>4</sub> smo sterilizirali s filtracijo.

1 M raztopina CaCl<sub>2</sub>:

11,1 g      CaCl<sub>2</sub> (Gram-Mol)  
do 100 ml    voda Milli-Q

Raztopljen CaCl<sub>2</sub> smo sterilizirali s filtracijo.

5 mM raztopina FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:

139 mg      FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma)  
do 100 ml    voda Milli-Q

Raztopljen FeSO<sub>4</sub> smo sterilizirali s filtracijo, raztopina mora biti sveže pripravljena tik pred uporabo.

Raztopina mikroelementov za gojišče M9:

371 mg      (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O (ΛΑΦΟΜΑ, Skopje)  
2,473 g     H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Carlo Erba)  
714 mg      CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Sigma)  
250 mg      CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Merck)  
1,583 g     MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (Merck)  
288 mg      ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma)  
do 100 ml    voda Milli-Q

Mikroelemente smo raztopili in raztopino sterilno prefiltrirali.

Raztopina 40-odstotne glukoze:

40 g      glukoza (Kemika)  
do 100 ml    voda Milli-Q

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

Priprava gojišča M9 z agarjem:

V erlenmajerico smo odpipetirali 100 ml raztopine makroelementov in 200 ml vode Mili-Q. V drugo erlenmajerico pa smo zatehtali 15 g agarja in dodali 693 ml vode Mili-Q. Sterilizirali smo z avtoklaviranjem, po avtoklaviranju smo obe raztopini takoj zmešali skupaj. Nato smo gojišče ohladili na 55 °C in mu dodali še:

5 ml	40-odstotna sterilna glukoza
1 ml	raztopina mikroelementov
1 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
100 µl	1 M CaCl <sub>2</sub>
200 µl	5 mM FeSO <sub>4</sub>

Gojišče smo potem aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke.

### 3.1.4 Trdna gojišča s cikloheksimidom

Gojišča hranilni agar, agar R2A in minimalni agar M9 smo pripravili tudi z dodanim antimikotikom cikloheksimidom v koncentraciji 50 mg/l. Litru gojišča, ohlajenemu na 55 °C, smo dodali 1 ml sterilne založne raztopine cikloheksimida (50 g/l). Založno raztopino cikloheksimida smo pripravili tako, da smo 500 mg cikloheksimida raztopili v 10 ml vode Milli-Q in sterilizirali s filtracijo.

Pripravili smo tudi 50-krat redčena trdna gojišča s cikloheksimidom.

### 3.1.5 Gojišče API 50 CHB/E

Založna raztopina soli:

2,5 g	etilendiamintetraocetna kislina, EDTA (Sigma)
10,95 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma)
5 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma)
1,54 g	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (Merck)
0,392 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (Merck)
0,248 g	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Fluka)
0,177 g	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O (Sigma)
1 l	destilirana voda
nekaj kapljic	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck)

Založno raztopino soli smo pripravili tako, da smo v destilirano vodo na magnetnem mešalu počasi dodajali eno sestavino za drugo, vsakič smo počakali, da se je predhodna sol raztopila.

Hunterjeva mineralna osnova brez vitaminov:

14,45 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Acros Organics)  
3,335 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck)  
9,25 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (ΛΑΦΟΜΑ, Skopje)  
99,0 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma)  
5 ml založna raztopina soli  
950 ml destilirana voda

Hunterjevo mineralno osnovo brez vitaminov (Hunter's vitamin free mineral base) smo pripravili brez nitrilotriocetne kisline. V destilirano vodo smo na magnetnem mešalu dodajali eno sestavino za drugo ter umerili pH na 6.8 (z 1M KOH ali 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), da so se vse sestavine raztopile.

Gojišče API 50 CHB/E:

2 g  $(\text{NH}_2)_4\text{SO}_3$  (Sigma)  
0,5 g kvasni ekstrakt (Biolife)  
1 g tripton (Biolife)  
3,22 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck)  
0,12 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)  
10 ml Hunterjeva mineralna osnova brez vitaminov  
0,17 g fenol rdeče (Sigma)  
1 l destilirana voda

Gojišče API 50 CHB/E smo pripravili tako, da smo v destilirano vodo na magnetnem mešalu eno za drugo dodajali sestavine, in mešali, dokler se ni vse raztopilo. Nato smo umerili pH med 7,4 in 7,8 (z 1M KOH ali 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ter gojišče sterilno prefiltrirali.

### 3.2 VZORČENJE LEDENIKOV RHONE (VALAIS, ŠVICA) IN GRINNELL (MONTANA, ZDA)

Avgusta 2013 smo jemali vzorce na ledeniku Rhone v švicarskih Alpah (Valais, Švica) in sicer v ledeni jami, ki je izkopana v sam ledenik, na površju ob robu ledenika in še samo ledeniško vodo. Septembra 2013 pa smo vzorčili na ledeniku Grinnell (Narodni park Glacier, Montana, ZDA) in sicer led in vodo iz ledeniškega jezera Upper Grinnell Lake tik pod ledenikom.

Vzorec ledu smo sprali s sterilno vodo in ga dali v sterilno plastično vrečko, prvo odtaljeno vodo smo odlili in vzorec stopili na sobni temperaturi. Vzorec smo nato prelili v sterilno plastenko. Pri vzorčenju vode smo le-to zajeli v sterilno plastenko. V času transporta do laboratorija so bili vzorci shranjeni pri 4 °C, v laboratoriju pa smo jih do analize shranili pri -80 °C.

### 3.3 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VZORCEV LEDU IN VODE LEDENIKOV

Za nacepljanje in gojenje bakterij iz vzorcev ledu in vode smo uporabili plošče s trdnimi gojišči z dodanim cikloheksimidom v koncentraciji 50 mg/l (M9, 50-krat redčen M9, R2A, 50-krat redčen R2A, hranilni agar in 50-krat redčen hranilni agar). V laminariju smo na ploščo vsakega gojišča aseptično nanesli po 0,1 ml vzorca, ki smo ga pred tem premešali na vibracijskem mešalu. S sterilnimi steklenimi kroglicami smo vzorec razmazali. Vse vzorce smo nanesli na vsa gojišča in jih inkubirali pri 4 °C, 15 °C in 30 °C.

Ko so zrasle kolonije, smo določili število morfološko različnih kolonij (morfotipov), prešteli število kolonij določenega morfotipa, jih opisali in slikali plošče. Večina kolonij, gojenih pri 30 °C in 15 °C, je zrasla v enem tednu, pri 4 °C pa po dveh tednih. Rast kolonij smo spremljali dva meseca. Nato smo iz vsake plošče precepili vse med seboj morfološko različne kolonije (po eno predstavnico vsakega morfotipa) in jih izolirali v čisti kulturi, gojili smo jih pri enakih pogojih in na enakih gojiščih kot matično ploščo. Analizirali nismo celotne bakterijske združbe ampak le tisti del, ki ga lahko gojimo.

Zaradi boljše preglednosti smo vzorce poimenovali z okrajšavami.

Ledenik Grinnell, Montana (ZDA):

- GL1; vzorec ledu 1 (več vključkov)
- GL2; vzorec ledu 2 (manj vključkov)
- GV; vzorec vode iz ledeniškega jezera

Ledenik Rhone (Švica):

- RL1; vzorec ledu 1 iz notranjosti ledenika
- RL2; vzorec ledu 2 iz notranjosti ledenika
- RL3; vzorec ledu 3 iz notranjosti ledenika
- Rsp; vzorec ledu iz spodnjega zunanjega dela ledenika
- Rzg; vzorec ledu iz zgornjega zunanjega dela ledenika
- RV; vzorec vode iz notranjosti ledenika



Slika 3: Ledenik Grinnell; mesto odvzema vzorcev, vzorca ledu GL1 in GL2 ter mesto odvzema vzorca vode GV (Foto: Turk M., 2013).



Slika 4: Ledenik Rhone; mesto odvzema in vzorci ledu RL1, RL2 in RL3 iz notranjosti ledenika, mesto odvzema vzorca vode RV in mesto odvzema vzorcev ledu Rzg in Rsp na zunanjem delu ledenika  
(Foto: Sonjak S. 2013).

### 3.4 IZOLACIJA DNA IN POMNOŽITEV GENA ZA 16S rRNA

Iz vseh čistih kultur bakterij smo izolirali DNA. V 1,5-ml centrifugirke po Eppendorfu smo dali po 35 µl reagenta za izolacijo DNA (PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent, Life Technologies) ter polno cepilno zanko sveže kulture bakterij. Na vibracijskem mešalu smo resuspendirali celice in jih nato 10 minut kuhalili pri 100 °C. Vzorce smo po kuhanju ohlajali 2 minuti pri sobni temperaturi, nato smo jih 2 minuti centrifugirali pri 16,000 × g in sobni temperaturi. Supernatant, v katerem se je nahajala izolirana matrična DNA, smo prenesli v sveže centrifugirke po Eppendorfu in ga shranili pri -20 °C do verižne reakcije s polimerazo.

Za verižno reakcijo s polimerazo (polymerase chain reaction – PCR) smo pripravili mešanico reagentov, za vsak vzorec po 35 µl. Reagente smo vzeli iz zamrzovalnika pri -20 °C, jih odtajali in dodajali po vrstnem redu, kot je navedeno spodaj. Vse smo delali na ledu.

Količina reagentov za 34,5 µl:

3,5 µl	10-kratni polimerazni pufer z MgCl <sub>2</sub> (Thermo Scientific)
0,35 µl	10 mM dNTP (mešanica deoksiribonukleotidov, Applied Biosystems)
0,35 µl	10 µM oligonukleotidni začetnik 27F
0,35 µl	10 µM oligonukleotidni začetnik 1495r
29,86 µl	voda Milli-Q
0,09 µl	polimeraza DreamTaq (5U/µl, Thermo Scientific)

Uporabljena oligonukleotidna začetnika:

27F (16S rRNA – bakterijski)	5'-GAGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'
1495r (16S rRNA – bakterijski)	5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'

V vsako epruveto za PCR smo odpipetirali po 34,5 µl reakcijske mešanice ter 0,5 µl izolirane matrične DNA. Nato smo jih dali v aparatu za PCR (PCR Mastercycler ep Gradient, Eppendorf) in izvedli verižno reakcijo s polimerazo s padajočo temperaturo prileganja (touchdown PCR) pri pogojih 5-minutne denaturacije pri temperaturi 94 °C, ki ji je sledilo 5 ciklov sestavljenih iz 30 s denaturacije pri temperaturi 94 °C, 30 s prileganja pri 60 °C in 1 min podaljševanjem pri 72 °C. Nato je sledilo 5 ciklov sestavljenih iz 30 s denaturacije pri temperaturi 94 °C, 30 s prileganja pri 55 °C in 1 min podaljševanjem pri 72 °C. Na koncu pa še 30 ciklov sestavljenih iz 30 s denaturacije pri temperaturi 94 °C, 30 s prileganja pri 50 °C in 1 min podaljševanjem pri 72 °C. Program se je zaključil s 7-minutnim podaljševanjem pri 72 °C in nato ohlajanjem na 4 °C.

### 3.5 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

#### 3.5.1 50-kratni Tris acetatni EDTA pufer (pufer TAE)

Sestavine za 50-kratni Tris acetatni EDTA pufer (pufer TAE):

242,0 g Tris baza (Sigma)  
57,1 g glacialna ocetna kislina (Sigma)  
100 ml 0,5 M EDTA s pH 8

Za pripravo 0,5 M EDTA (pH 8) smo zatehtali 146,3 g EDTA in dodali 800 ml destilirane vode ter z 1M NaOH umerili pH na 8,0, da se je EDTA popolnoma raztopila. Nato smo dopolnili raztopino z vodo do enega litra in avtoklavirali.

Tris bazo smo raztopili v 600 ml destilirane vode. Nato smo dodali ostale sestavine in dopolnili z destilirano vodo do 1 litra. Pufer smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C in 1,2 atm in ga shranili na sobni temperaturi. Za uporabo pri elektroforezi smo pripravili 1-kraten pufer TAE s 50-kratnim redčenjem založne raztopine z destilirano vodo.

#### 3.5.2 6-kratni nanašalni pufer z barvilo Orange G

Sestavine za 6-kratni nanašalni pufer z barvilo Orange G:

2 ml 50-kratni pufer TAE  
0,15 g barvilo Orange G  
60 ml glicerol  
do 100 ml voda Mili-Q

#### 3.5.3 Izvedba agarozne gelske elektroforeze

Po končani PCR smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili, če je bila reakcija uspešna. Pripravili smo 1-odstotni agarozni gel tako, da smo zatehtali ustrezeno količino agaroze (Sigma), dodali ustrezeno količino 1-odstotnega pufra TAE in agarozo raztoplili v mikrovalovni pečici. Nekoliko ohlajeni raztopljeni agarozi smo dodali barvilo SYBR Safe (Invitrogen) in sicer 10 µl na 100 ml 1-odstotne agaroze, premešali in razlili v pripravljeni nosilec, da se je gel strdil.

Petim mikrolitrom vzorca pomnožene DNA smo pred nanosom na gel dodali 2 µl nanašalnega pufra z barvilo Orange G, kot standard pa smo na gel nanesli tudi mešanico fragmentov DNA znanih velikosti (GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus,

Thermo Scientific). Elektroforezo smo izvedli pri napetosti 120 V (BioRad). Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV-transluminatorjem in ga fotografirali. Velikost pomnožene DNA smo določili primerjalno s fragmenti DNA znanih velikosti.

### 3.6 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

#### 3.6.1 Sekvenciranje gena za 16S rRNA in identifikacija bakterijskih izolatov

Vse uspele pomnožke PCR primerne velikosti smo poslali na sekvenciranje v laboratorij Microsynth (Švica). Dobljenim delnim nukleotidnim zaporedjem gena za 16S rRNA smo poiskali homologe med objavljenimi nukleotidnimi zaporedji s pomočjo iskalnikov podatkovne zbirke Ribosomal Database Project-II (3.7.2014) (Cole in sod., 2014) in iskalnika BLAST Nacionalnega centra za biotehnološke informacije (Altschul in sod., 1997; BLAST, 2014) v neredundantni podatkovni zbirki GenBank. Čiste bakterijske kulture identificiranih sevov smo shranili v Mikrobiološko zbirko Ex Infrastrukturnega centra Mycosmo (MRIC UL) pri -80 °C v vialah sistema Microbank (Pro-Lab Diagnostic).

#### 3.6.2 Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNA izolatov rodov *Janthinobacterium* in *Duganella*

Za filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij gena za 16S rRNA smo v poravnavo vključili pridobljena nukleotidna zaporedja iz naših izoliranih sevov rodov *Janthinobacterium* ter *Duganella* in zaporedja vrst rodu *Janthinobacterium*, ki smo jih pridobili iz podatkovne zbirke GenBank (NCBI). Nukleotidna zaporedja smo med seboj poravnali z algoritmom L-INS-i v programu MAFFT 7 (Katoh in Toh, 2008; MAFFT 7, 2014). S programom ModelTest (Posada in Crandall, 1988) smo ocenili, da je najbolj ustrezен substitucijski model TrN (Tamura-Nei), ocenili pa smo tudi delež nevariabilnih nukleotidnih mest (0,91) in gama parameter porazdelitve hitrosti evolucije (0,64). Te podatke smo uporabili za izdelavo filogenetskega drevesa s programom PhyML 3.1 (Guindon in sod., 2010). Dobljeno filogenetsko drevo smo prikazali v programu MEGA 6 (Tamura in sod., 2007).

### 3.7 UGOTAVLJANJE ODPORNOSTI BAKTERIJSKIH IZOLATOV PROTI SKUPINAM ANTIBIOTIKOV

Pripravili smo hranilni agar z različnimi antibiotiki. Vse identificirane seve smo nacepili na vsa gojišča z antibiotiki in na hranilni agar brez dodanih antibiotikov ter jih inkubirali pri enaki temperaturi, kot smo jih izolirali. Rezultate smo odčitali po enem tednu pri temperaturah 15 °C in 30 °C, ter po dveh tednih pri temperaturi 4 °C. Za

preverjanje učinkovitosti antibiotikov v gojiščih smo kot kontrolo uporabili sev *Escherichia coli* BL-11, ki smo ga nacepili na gojišča z antibiotiki in brez. Za ugotavljanje odpornosti bakterijskih izolatov proti uporabljenim antibiotikom smo primerjali rast izolatov na ploščah z antibiotiki z rastjo na samem hrnilnem agarju.

### 3.8 UGOTAVLJANJE MINIMALNE IN MAKSIMALNE RASTNE TEMPERATURE IZOLATOV

Na hrnilni agar smo nacepili vse identificirane seve in nato vsak sev inkubirali pri različnih temperaturah; 4 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C in 37 °C. Seve, ki so rasli tudi pri 37 °C smo inkubirali še pri 40 °C in 45 °C in nato tri tedne spremljali njihovo rast.

### 3.9 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI PRODUKCIJE N-ACIL HOMOSERIN LAKTONOV PRI IZOLATIH IZ RODOV *Janthinobacterium* IN *Duganella* Z INDIKATORSKIM SEVOM *Chromobacterium violaceum* CV026

S sevom *Chromobacterium violaceum* CV026 lahko eksperimentalno zaznamo prisotnost acil homoserin laktonov (AHL) in posledično medceličnega sporazumevanja pri bakterijah. Sev ima okvarjen gen za produkcijo signalnih molekul, vendar ima ohranjeno sposobnost sinteze vijoličnega pigmenta violaceina. Če so v okolini v zadostni koncentraciji prisotni N-heksanoil homoserin laktoni ali podobni AHL, začne sev sintetizirati violacein, kar se pokaže v spremembi barve kolonij v vijolično (Blosser in Gray, 2000).

Poskus smo zastavili po vzoru Steindler in Venturi (2006). Na hrnilni agar smo nacepili v dveh navpičnih črtah indikatorski sev *C. violaceum* CV026, ki je neobarvan, in pravokotno nanj testirane seve tako, da so bili od indikatorskega seva oddaljeni 0,5 cm. Inkubirali smo jih 3 dni pri 20 °C. Če so testirani sevi izločali N-acil homoserin laktone, podobne tistim, ki uravnavaajo sintezo violaceina pri indikatorskemu sevu CV026, se je ta na mestu blizu testiranega seva obarval vijolično.

### 3.10 PRIMERJAVA ABSORPCIJSKIH SPEKTROV PIGMENTOV PRI IZOLATIH IZ RODOV *Janthinobacterium* IN *Duganella*

Izolacijo pigmentov smo delali po vzoru Logan in Moss (1992). Izolate iz rodov *Janthinobacterium* in *Duganella* smo precepili na trdno gojišče M9. Za vsak vzorec smo pripravili dve centrifugirki po Eppendorfu, v prvo smo dali 1 ml 96-odstotnega etanola, v drugo pa 1 ml 10-odstotne  $H_2SO_4$  razredčene v 96-odstotnem etanolu. V vsaki epici smo s polminutnim mešanjem na vibracijskemu mešalniku resuspendirali

polno cepilno zanko sveže kulture bakterij. Ob mešanju smo barvilo ekstrahirali v topilo, celice pa smo odstranili z dvakratnim 10-minutnim centrifugiranjem pri  $16,000 \times g$  in sobni temperaturi. Po  $300 \mu\text{l}$  dobljenih supernatantov smo prenesli v mikrotitrsko ploščico in s spektroforometrom (Multiskan Spectrum Plate Reader, Thermo Scientific) izmerili absorbanco med 200 in 800 nm.

### 3.11 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI RAZGRADNJE SLADKORJEV PRI IZOLATIH IZ RODOV *Janthinobacterium* S TESTOM API 50 CH (BioMerieux)

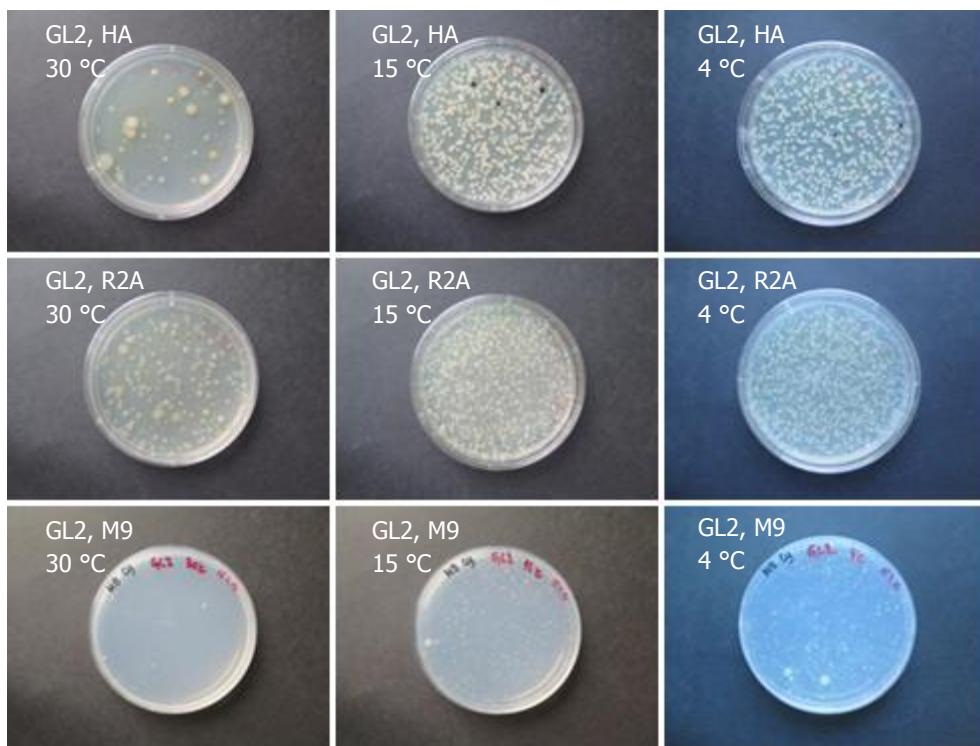
Za večino sevov iz rodov *Janthinobacterium* smo izvedli test razgradnje različnih sladkorjev API 50 CH po navodilih proizvajalca (BioMerieux). Polno cepilno zanko sveže kulture s trdnega gojišča M9 smo resuspendirali v 10 ml gojišča API 50 CHB/E. S pipeto smo nato previdno napolnili žepke v testni galeriji in jih dali v priložene predhodno pripravljene vlažne komore. Teste smo inkubirali 72 ur pri  $20^\circ\text{C}$ , ter nato odčitali rezultate. Opazovali smo spremembo barve iz rdeče v rumeno. Glede na stopnjo spremembe barve smo rezultate ocenili kot – (ni spremembe), + (sprememba barve v oranžno) in ++ (sprememba barve v rumeno).

## 4 REZULTATI

V eksperimentalnem delu naloge smo iz vzorcev ledu in vode izbranih ledenikov izolirali in identificirali 278 bakterijskih sevov. Za nadaljnje delo smo izbrali 217 sevov, od tega jih je bilo 87 izoliranih iz ledenika Grinnell in 130 iz ledenika Rhone. Proučili smo njihovo odpornost proti izbranim antibiotikom in jih fiziološko okarakterizirali glede na temperaturni razpon rasti. V nadaljevanju smo se osredotočili na seve iz rodov *Janthinobacterium* in *Duganella*. Pri jantinobakterijah smo določili sposobnost razgradnje različnih sladkorjev z API 50 CHB/E testom, pri obeh pa sposobnost produkcije signalnih molekul, ki jih zaznamo s pomočjo indikatorskega seva *Chromobacterium violaceum* CV026, in primerjali absorpcijske spektre izoliranih pigmentov.

### 4.1. IZOLACIJA BAKTERIJ IZ LEDENIKOV

Prve bakterijske kolonije na nacepljenih gojiščih so se pojavile drugi in tretji dan inkubacije, rast na ploščah smo nato spremljali vsake tri dni. Po 6 dneh je pri 30 °C in 15 °C zrasla večina kolonij, pri 4 °C pa šele po dobrih dveh tednih. Plošče smo ponovno pregledali po enem in dveh mesecih od časa nacepitve. Največ kolonij je zraslo pri temperaturah 4 °C in 15 °C, precej manj jih je zraslo pri 30 °C, vendar so te zrasle bistveno hitreje. Na gojiščih, ki so bila 50-krat redčena so zrasle podobne kolonije kot pri neredčenih gojiščih, zato jih v nadalnjem delu nismo uporabili. Primer rasti gojiljivih, aerobnih, kemoheterotrofnih bakterij v enem izmed vzorcev na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah je prikazan na sliki 5.



Slika 5: Rast bakterij po nacepljanju 0,1 ml vzorca ledu iz ledenika Grinnell (GL2) na različna gojišča s cikloheksimidom (HA, R2A in M9) pri temperaturah 30 °C (inkubacija 6 dni), 15 °C (inkubacija 6 dni) in 4 °C (inkubacija 17 dni).

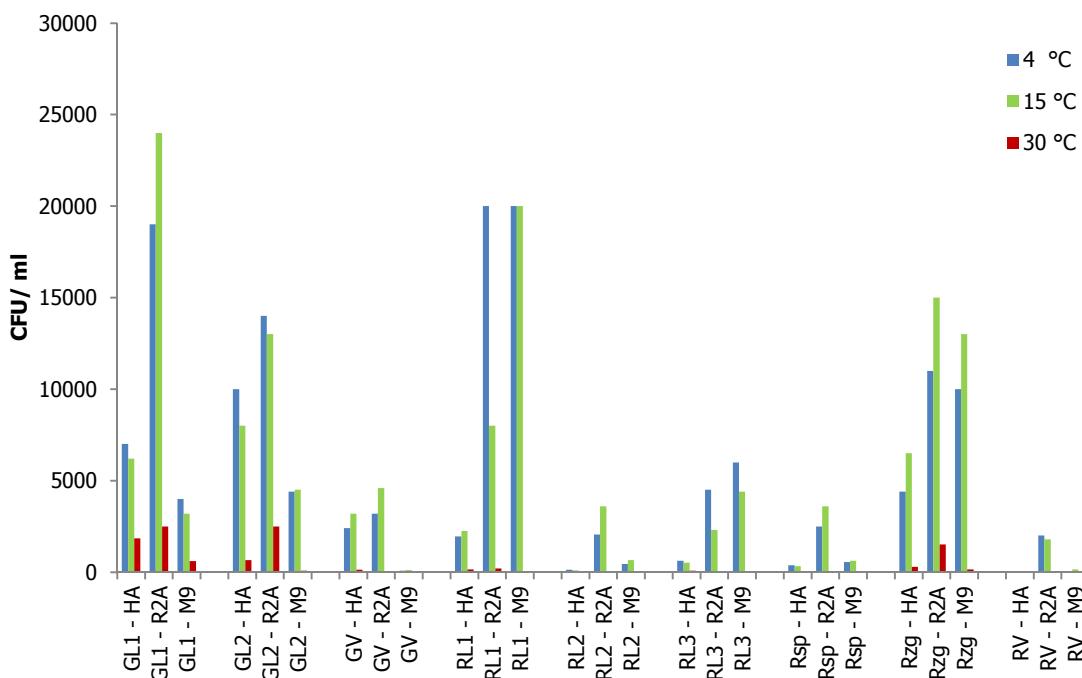
Na sliki 6 je prikazano število kolonijskih enot (CFU) gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij na ml vzorca. Vzorci so bili nacepljeni na gojišča HA, R2A, M9 in inkubirani pri temperaturah 4 °C, 15 °C in 30 °C. Kot najboljše gojišče se je izkazalo gojišče R2A, kjer je v povprečju zraslo več kolonij kot na gojiščih HA in M9.

Iz vzorcev ledenika Grinnell je zraslo več bakterij kot iz vzorcev ledenika Rhone. Povprečno število bakterij iz vseh vzorcev, na gojišču R2A in pri treh temperaturah, je bilo v primeru ledenika Grinnell 9.207 CFU/ ml, v primeru ledenika Rhone pa 1.447 CFU/ ml.

Število bakterij je bilo večje v vzorcih ledu kot v vzorcih vode. Na gojišču R2A pri različnih temperaturah je bilo v vzorcih ledu ledenika Grinnell med 2.500 in 24.000 CFU/ ml, v vzorcu ledeniškega jezera pa med 70 in 3.200 CFU/ ml. V vzorcih ledu ledenika Rhone je bilo na gojišču R2A pri različnih temperaturah med 10 in 20.000 CFU/ ml in v vzorcu izcedne vode med 70 in 2.000 CFU/ ml.

Največ bakterij je zraslo pri 4 °C in 15 °C, manj pa pri 30 °C. V vzorcih ledenika Grinnell je na gojišču R2A pri 4 °C in 15 °C zraslo med 3.200 in 24.000 CFU/ ml, pri 30 °C pa med 70 in 2.500 CFU/ ml. V vzorcih ledenika Rhone je na gojišču R2A pri 4 °C in 15 °C zraslo med 1.800 in 20.000 CFU/ ml, pri 30 °C pa med 10 in 1.510 CFU/ ml.

V vzorcih ledu, ki so bili izpostavljeni zunanjosti, je bilo več bakterij, ki so rasle pri 30 °C kot v vzorcih iz notranjosti ledenika. Na gojišču R2A pri 30 °C so imeli vzorci površinskega ledu ledenikov Grinnell in Rhone med 20 in 2.500 CFU/ ml, vzorci notranjega ledu ledenika Rhone pa med 10 in 200 CFU/ ml.

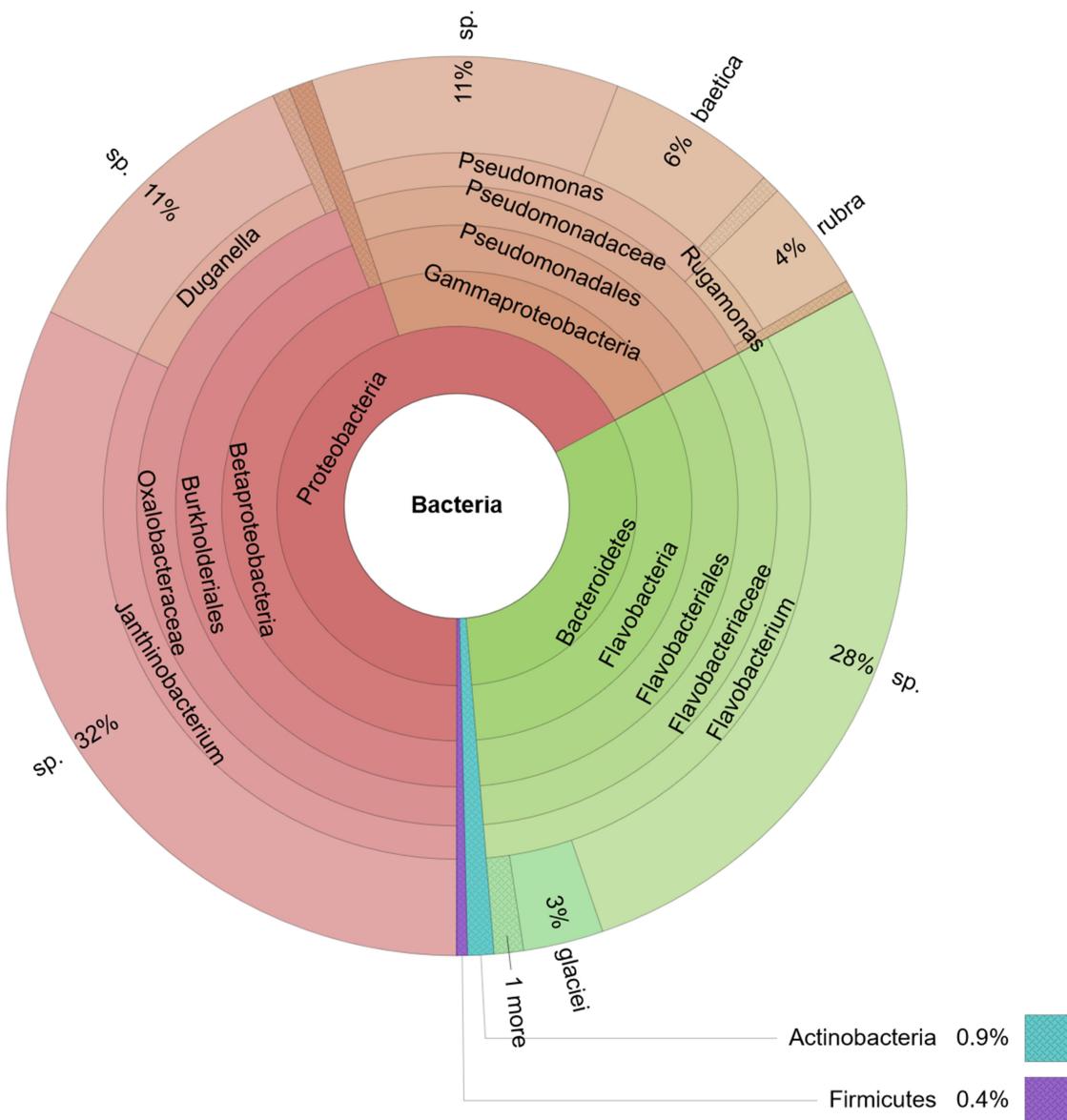


Slika 6: Število kolonijskih enot gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij na ml vzorca (CFU/ ml), ki so zrasle iz različnih vzorcev pri različnih gojiščih in temperaturah inkubacije (označbe vzorcev – glej poglavje 3.3; gojišča: HA – hranilni agar, R2A – Reasonerjev 2A agar, M9 – minimalni agar).

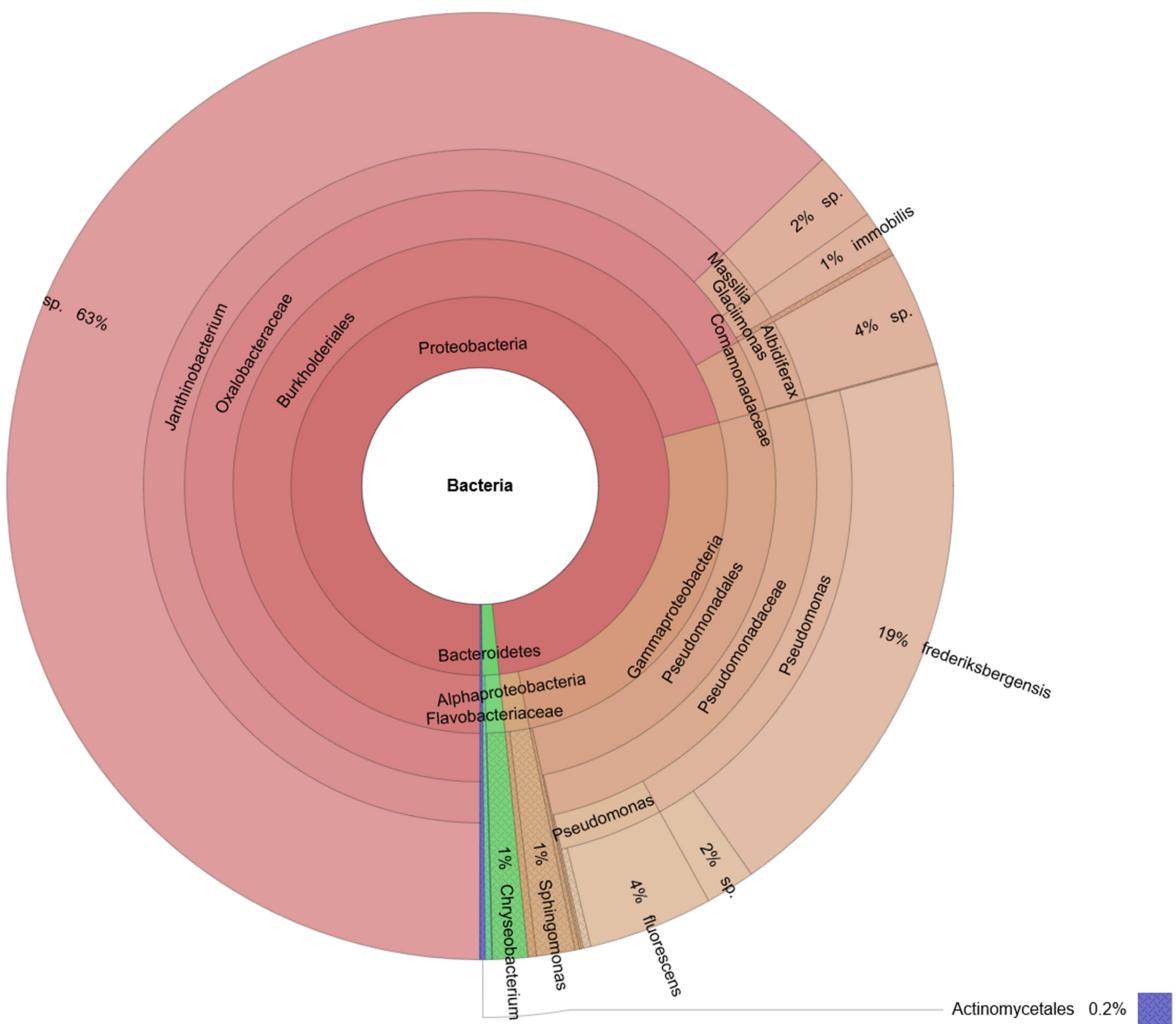
#### 4.2 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJ

Izolate gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij smo identificirali na osnovi delnega zaporedja gena za 16S rRNA. Teh 278 bakterijskih izolatov je pripadalo 33-im različnim rodovom. Iz vzorcev ledenika Grinnell smo identificirali 30 različnih vrst bakterij (priloga A), ki pripadajo 14 rodovom, iz vzorcev ledenika Rhone pa smo identificirali 35 različnih vrst (priloga A), ki pripadajo 24 rodovom. Med identificiranimi izolati je bilo 7 vrst in 5 rodov skupnih obema ledenikoma. Večinski delež v obeh ledenikih so predstavljali izolati iz rodu *Janthinobacterium*.

S štetjem morfološko podobnih bakterijskih kolonij smo ocenili, kakšen delež posamezne vrste kemoheterotrofnih bakterij predstavljajo izolirani in identificirani sevi v posameznem ledeniku. V ledeniku Grinnell (slika 7) so predstavljale bakterije iz rodov *Janthinobacterium* 32, *Flavobacterium* 28, *Pseudomonas* 18, *Duganella* 11 in *Rugamonas* 4 odstotni delež. Iz rodov *Arthrobacter*, *Carnobacterium*, *Caulobacter*, *Exiguobacterium*, *Massilia*, *Micrococcus*, *Mitsuaria*, *Pelomonas* in *Rhodococcus* smo identificirali le po nekaj predstavnikov. V ledeniku Rhone (slika 8) so predstavljale bakterije iz rodov *Janthinobacterium* 63, *Pseudomonas* 26, *Albidiferax* 4 in *Massillia* 2 odstotni delež. Izolirali smo le nekaj predstavnikov iz rodov *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Corynebacterium*, *Epilithonimonas*, *Frondihabitans*, *Glaciimonas*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Muciluginibacter*, *Noviherbspirillum*, *Pedobacter*, *Polaromonas*, *Rhodoferax*, *Rugamonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Subtercola*, *Undibacterium* in *Xylophilus*.



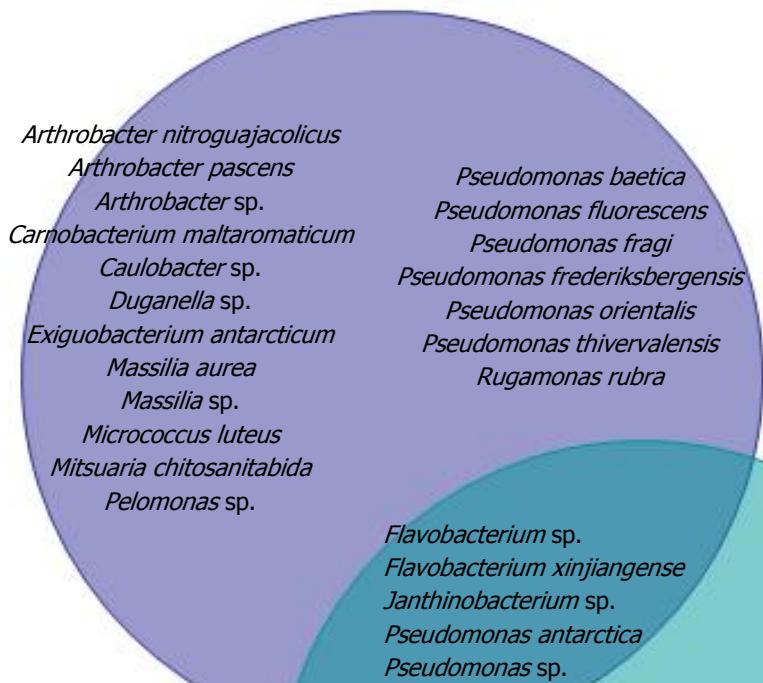
Slika 7:Ocenjeni deleži identificiranih gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij v ledeniku Grinnell.



Slika 8: Ocenjeni deleži identificiranih gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij v ledeniku Rhone.

Opazne so bile tudi razlike v bakterijski sestavi med vzorci iz različnih delov ledenikov. Pri ledeniku Grinnell je bilo v vzorcih ledu in ledeniške vode skupnih le 5 identificiranih vrst (slika 9). Pri ledeniku Rhone sta bili med vzorci zunanjega ledu, notranjega ledu in ledeniške vode skupni le 2 identificirani vrsti (slika 10). Opazne razlike so bile tudi med vzorci notranjega in zunanjega ledu, kjer je bilo od 32 identificiranih vrst skupnih le 8 (slika 10).

### ZUNANJI LED

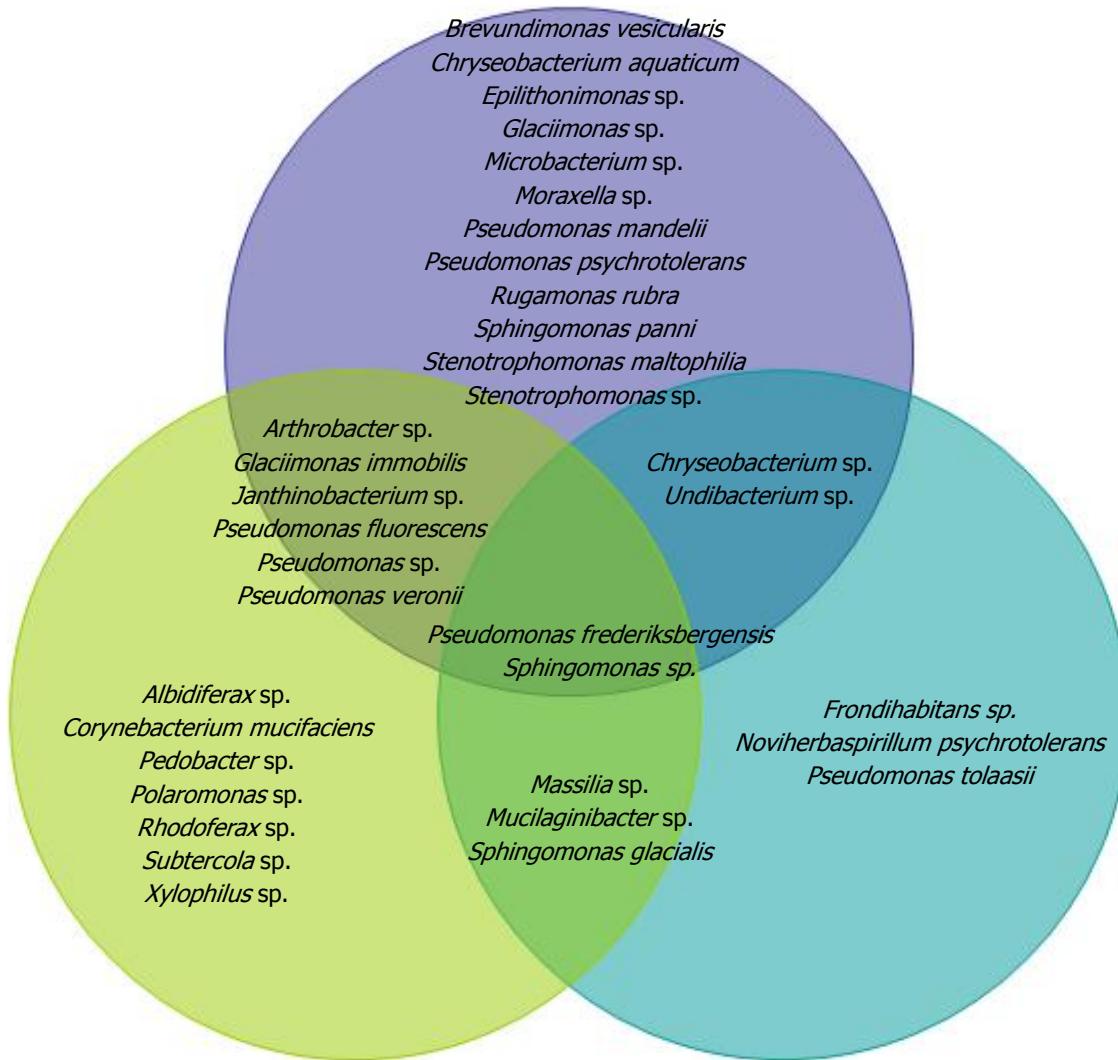


*Arthrobacter scleromae*  
*Flavobacterium glaciei*  
*Pseudomonas mandelii*  
*Pseudomonas moorei*  
*Pseudomonas trivialis*  
*Rhodococcus* sp.

### LEDENIŠKA VODA

Slika 9: Bakterijska sestava zunanjega ledu in ledeniške vode v ledeniku Grinnell.

## ZUNANJI LED



## NOTRANJI LED

## LEDENIŠKA VODA

Slika 10: Bakterijska sestava notranjega in zunanjega ledu ter ledeniške vode v ledeniku Rhone.

Shannon-Wienerjev diverzitetni indeks smo s pomočjo programa Microsoft Excel izračunali po spodnji enačbi:

$$H' = - \sum (p_i * \ln p_i) \quad \dots (1)$$

$p_i$  = delež posamezne vrste v vzorcu

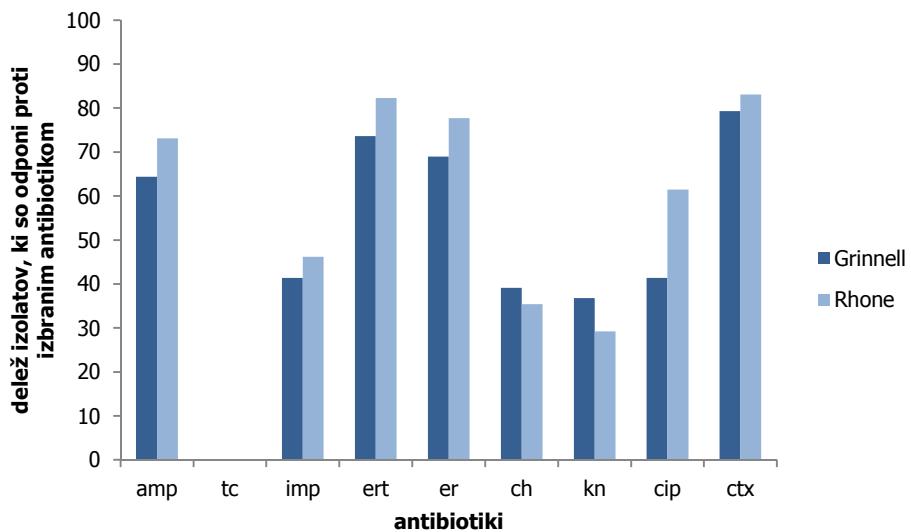
$H'$  (Grinell) = 1,88

$H'$  (Rhone) = 1,32

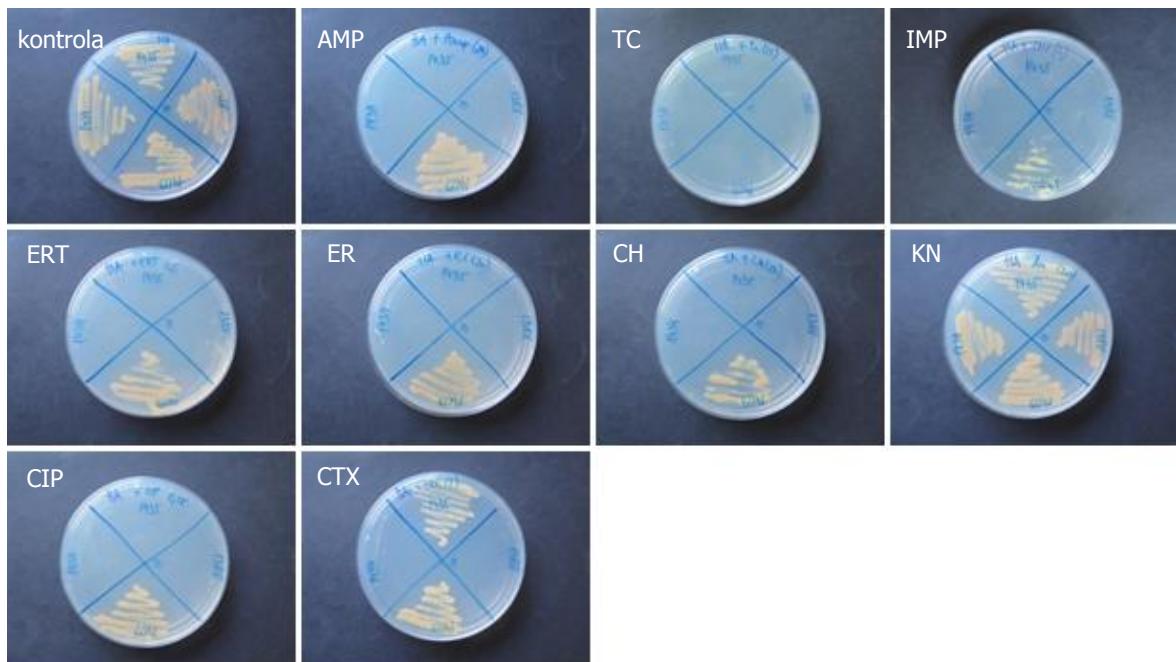
Ledenik Grinnell ima višji diverzitetni indeks, ledenik Rhone pa nižjega, saj kar 63 odstotkov celotne identificirane združbe gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij predstavlja vrsta *Janthinobacterium* sp..

#### 4.3 ODPORNOST BAKTERIJSKIH IZOLATOV PROTI RAZLIČNIM ANTIBIOTIKOM

Za ugotavljanje odpornosti proti različnim antibiotikom smo 217 izbranih sevov nacepili na gojišča z dodanimi antibiotiki (ampicilin (50 mg/l), tetraciklin (15 mg/l), imipenem (2 mg/l), ertapenem (0,5 mg/l), eritromicin (15 mg/l), kloramfenikol (25 mg/l), kanamicin (20 mg/l), ciprofloksacin (0,25 mg/l) in cefotaksim (2 mg/l) ter opazovali njihovo rast. Rezultati so podani v prilogi B. Rast bakterij smo spremljali dva tedna. Velik delež izolatov je bil odporen proti izbranim antibiotikom v določenih koncentracijah, kjer izstopajo ampicilin (50 mg/l), ertapenem (0,5 mg/l), eritromicin (15 mg/l) in cefotaksim (2 mg/l) (slika 11). Proti slednjemu je bilo odpornih kar 79 odstotkov izolatov iz ledenika Grinnell in 83 odstotkov izolatov iz ledenika Rhone. Proti imipenemu (2 mg/l), kloramfenikolu (25 mg/l) in kanamicinu (20 mg/l) je bilo odpornih med 29 in 46 odstotki izolatov posameznih ledenikov, medtem ko proti tetraciklinu (15 mg/l) ni bil odporen noben izmed testiranih izolatov. Odpornost izolatov je podobna pri obeh ledenikih, nekoliko večje odstopanje je le v primeru ciprofloksacina (0,25 mg/l), kjer je bilo odpornih približno 41,4 odstotkov izbranih sevov iz ledenika Grinnell in 61,8 odstotkov iz ledenika Rhone. Večina izolatov je bila odporna proti dvema ali več različnim antibiotikov. Primer odpornosti izbranih bakterijskih izolatov proti različnim antibiotikom je prikazan na sliki 12.



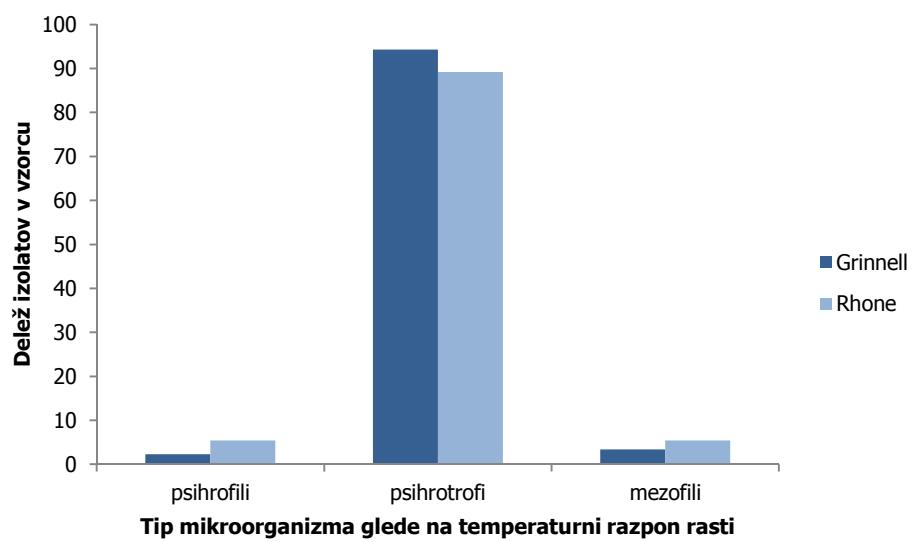
Slika 11: Delež izoliranih sevov iz ledenikov Grinnell in Rhone, ki so odporni proti testiranim antibiotikom (amp - ampicilin (50 mg/l), tc - tetraciklin (15 mg/l), imp - imipenem (2 mg/l), ert - ertapenem (0,5 mg/l), er - eritromicin (15 mg/l), ch - kloramfenikol (25 mg/l), kn - kanamicin (20 mg/l), cip - ciprofloksacin (0,25 mg/l) in ctx - cefotaksim (2 mg/l).



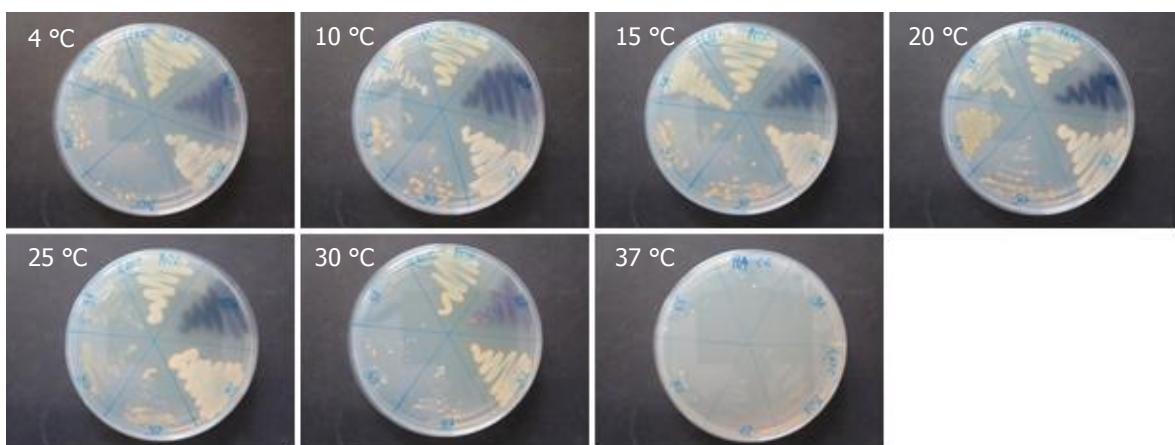
Slika 12: Primer odpornosti proti antibiotikom izbranih sevov vrste *Flavobacterium* sp.. Na prvi sliki je kot kontrola gojišče brez dodanih antibiotikov, nato si sledijo gojišča z ampicilinom - amp (50 mg/l), tetraciklinom - tc (15 mg/l), imipenemom - imp (2 mg/l), ertapenemom - ert (0,5 mg/l), eritromicinom - er (15 mg/l), kloramfenikolom - ch (25 mg/l), kanamicinom - kn (20 mg/l), ciprofloksacinom - cip (0,25 mg/l) in cefotaksimom - ctx (2 mg/l).

#### 4.4 FIZIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV GLEDE NA NJIHOV TEMPERATURNI RAZPON RASTI

Za ugotavljanje kardinalnih temperatur rasti izolatov smo le-te nacepili na hranilni agar in jih inkubirali pri različnih temperaturah (4, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40 in 45 °C). Rast na ploščah smo spremljali 30 dni. Rezultati so predstavljeni v prilogi B. Med psihrofile smo uvrstili izolate, ki so rasli med 4 °C in 20 °C, med psihrotrofe tiste, ki so rasli med 4 °C in 40 °C, med mezofile pa tiste, ki so rasli med 10 – 15 °C in 45 °C. Večina izoliranih sevov (slika 13) je spadala med psihrotrofe (Grinnell - 94,3 odstotkov; Rhone - 89,2 odstotka), zelo majhen delež pa je spadal med psihrofile (Grinnell - 2,3 odstotkov; Rhone - 5,4 odstotkov) in mezofile (Grinnell – 3,4 odstotkov; Rhone – 5,4 odstotkov). Izolirali nismo nobenega termofila, kajti pri 45 °C naši izolati niso več rasli (Todar Kenneth, 2006). Primer rasti izbranih bakterijskih izolatov pri različnih temperaturah je prikazan na sliki 14.



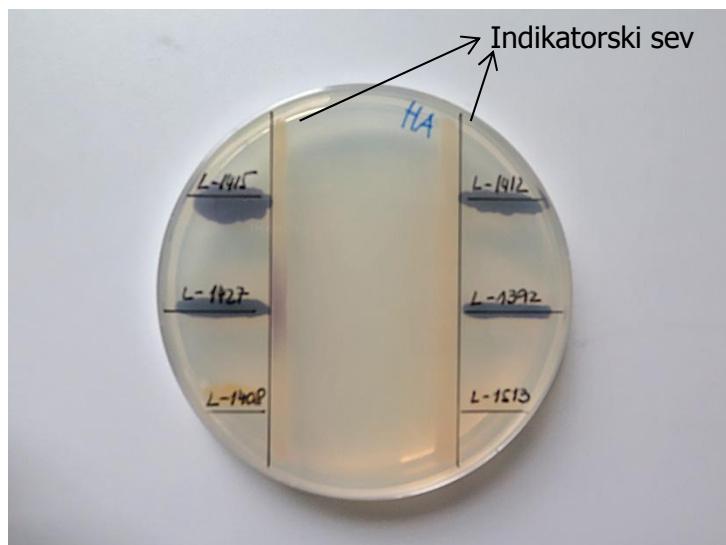
Slika 13: Deleži izoliranih sevov iz ledenikov Grinnell in Rhone, ki glede na temperaturni razpon rasti spadajo med psihrofile, psihrotrofe in mezofile.



Slika 14: Primer rasti izbranih sevov *Janthinobacterium* sp., *Duganella* sp. in *Rugamonas rubra*, pri različnih temperaturah.

#### 4.5 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI PRODUKCIJE N-ACIL HOMOSERIN LAKTONOV PRI IZOLATIH IZ RODOV *Janthinobacterium* IN *Duganella* Z INDIKATORSKIM SEVOM *Chromobacterium violaceum* CV026

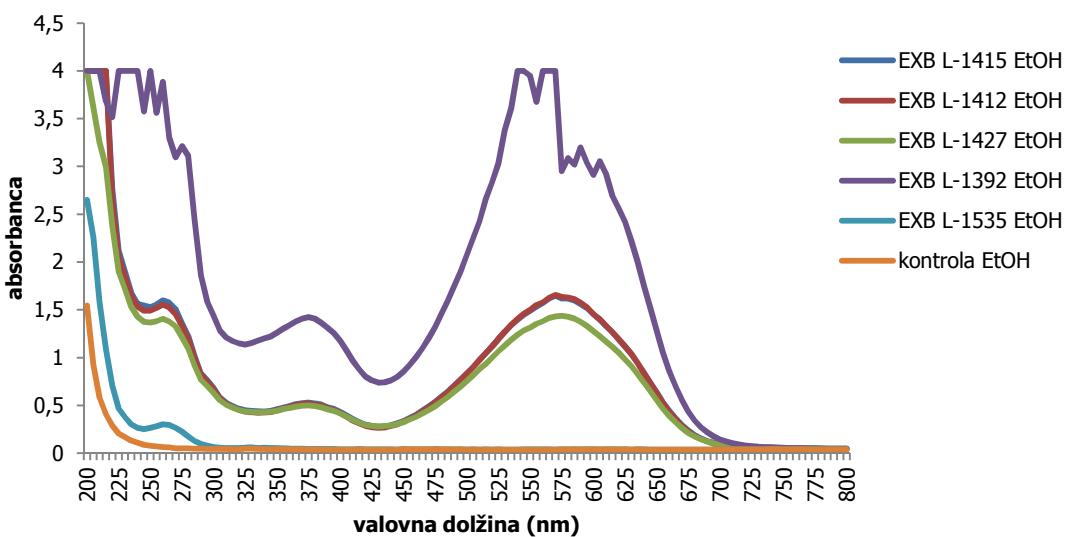
Na hranilni agar smo nacepili seve iz rodu *Janthinobacterium* in seva iz rodu *Duganella* skupaj z indikatorskim sevom *Chromobacterium violaceum* CV026, ki ima mutiran gen za sintezo homoserin laktona, in jih inkubirali pri 20 °C. V primeru, da je naš izolat produciral homoserin laktone, se je indikatorski sev obarval vijolično (slika 15). Homoserin lakton, ki sproži sintezo pigmenta violaceina v indikatorskem sevu, je produciral le sev EXB L-1427 (*Janthinobacterium* sp.).



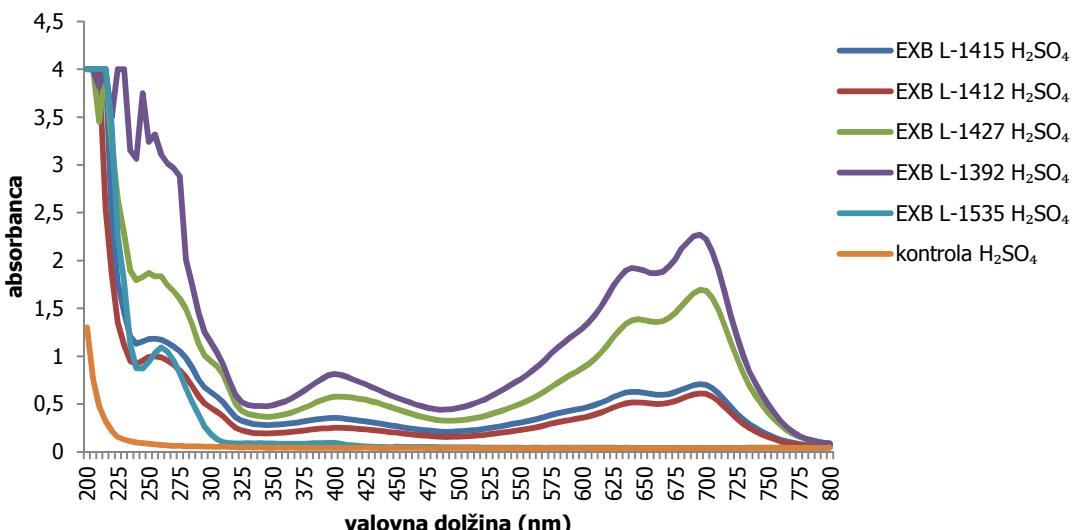
Slika 15: Ugotavljanje sposobnosti produkcije homoserin laktonov z indikatorskim sevom *C. violaceum*.  
Sev *Janthinobacterium* sp. EXB L-1427, ki izloča homoserin lakton, je pri indikatorskem sevu (na gojišču nacepljen vertikalno glede na testirane seve) sprožil sintezo pigmenta violaceina.

#### 4.6 PRIMERJAVA ABSORPCIJSKIH SPEKTROV PIGMENTOV PRI IZOLATIH IZ RODOV *Janthinobacterium* IN *Duganella*

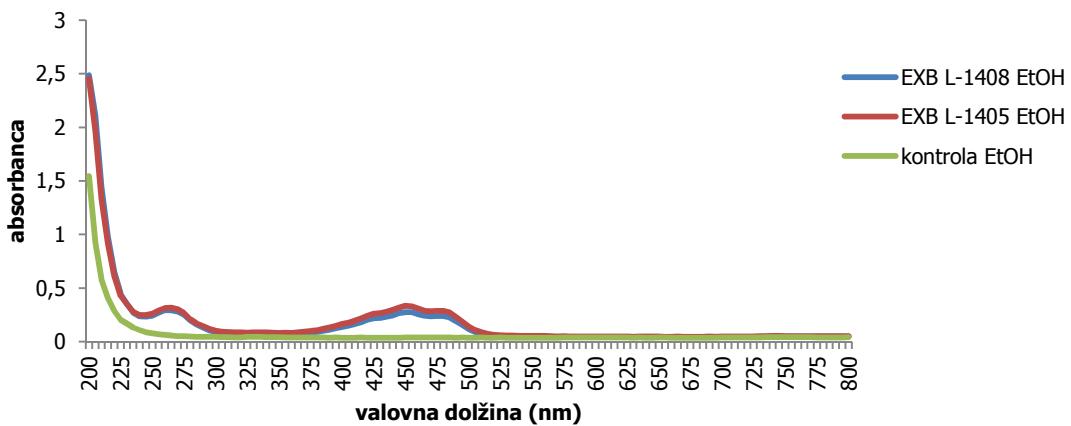
Ekstrahirali smo pigmente iz kultur izolatov rodu *Janthinobacterium* in *Duganella* ter jim s spektrofotometrom izmerili absorbanco. Na osnovi rezultatov meritev smo narisali absorpcijske spektre (slike 16-19). Prisotnost pigmentov smo zaznali pri štirih izolatih iz rodu *Janthinobacterium*, ki so tvorili temno vijolično obarvane kolonije (L-1392, L-1412, L-1415, L-1427) in pri dveh testiranih izolatih iz rodu *Duganella*, ki sta tvorila rumeno obarvane kolonije (L-1405, L-1408). S 96-odstotnim etanolom ekstrahirani vijolični pigmenti iz vijolično obarvanih sevov *Janthinobacterium* (L-1392, L-1412, L-1412, L-1427), so imeli absorpcijski maksimum pri približno 580 nm (slika 16). Oba rumena pigmenta iz izolatov rodu *Duganella* (L-1405, L-1408), ekstrahirana v 96-odstotnem etanolu sta imela absorpcijski maksimum pri 450 nm (slika 18). Vsi vijolični pigmenti, ekstrahirani z 10-odstotno  $H_2SO_4$  razredčeno v 96-odstotnem etanolu, so imeli absorpcijski maksimum pri približno 700 nm (slika 17), rumena pigmenta pa pri 425 nm (slika 19).



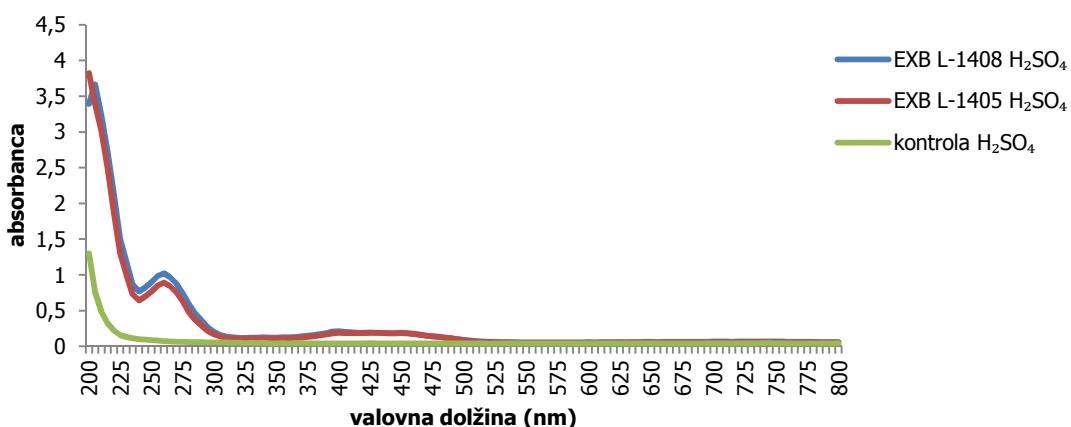
Slika 16: Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu *Janthinobacterium* (L-1392, L-1412, L-1412, L-1427 in L-1535, ki ni tvoril pigmentov), ekstrahiranih s 96-odstotnim etanolom.



Slika 17: Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu *Janthinobacterium* (L-1392, L-1412, L-1427 in L-1535, ki ni tvoril pigmentov), ekstrahiranih z 10-odstotno  $\text{H}_2\text{SO}_4$  razredčeno v 96-odstotnem etanolu.



Slika 18: Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu *Duganella* (L-1405, L-1408), ekstrahiranih s 96-odstotnim etanolom.

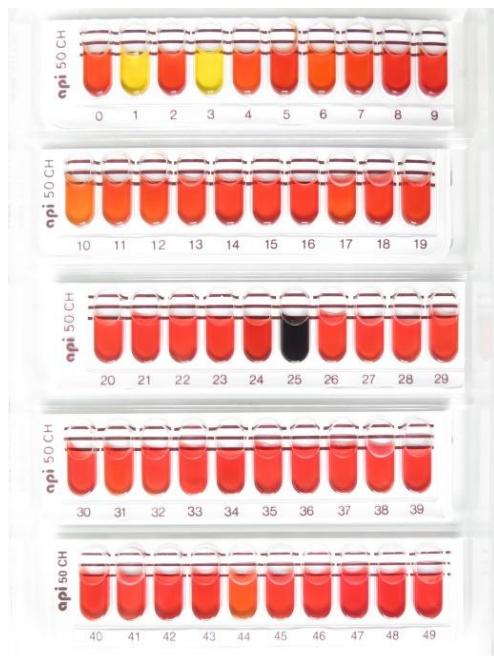


Slika 19: Absorpcijski spektri pigmentov iz kultur izbranih sevov rodu *Duganella* (L-1405, L-1408), ekstrahiranih z 10-odstotno  $\text{H}_2\text{SO}_4$  razredčeno v 96-odstotnem etanolu.

#### 4.7 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI RAZGRADNJE SLADKORJEV PRI IZOLATIH IZ RODOV *Janthinobacterium* S TESTOM API 50 CH (BioMerieux)

Za ugotavljanje sposobnosti razgradnje sladkorjev smo izbrali 50 sevov iz rodu *Janthinobacterium*. Večina izbranih sevov rodu *Janthinobacterium* je lahko kot vir energije uporabljala glicerol, eskulin, galaktozo in D-glukozo. Malo manj kot polovica jih je razgrajevala D-arabinozo, D-fruktozo in D-manozo. Večina jih je razgrajevala po nekaj sladkorjev, medtem ko so trije vijolično obarvani sevi razgrajevali skoraj polovico testiranih sladkorjev.

Za primerjavo sevov *Janthinobacterium*, smo rezultate za vrste *J. agaricodamnosum*, *J. lividum* in *J. svalbardensis* povzeli po diplomskem delu Tinke Hovnik (2005). Rezultati so prikazani v preglednici 2. Profil razgradnje sladkorjev pri testiranih izolatih je bil podoben profilu *J. lividum* in *J. agaricodamnosum*.



Slika 20: Primer testa API50 (BioMerieux). Test je pozitiven, če se barva testa spremeni iz rdeče v oranžno ali rumeno, razen v primeru testa št. 25, ki je pozitiven, če se barva spremeni iz rdeče v črno.

Preglednica 2: Rezultati testa API 50 CH (BioMerieux).

	<i>J. agaricidamnosum</i>	<i>J. lividum</i>	<i>J. svalbardensis</i>	1392	1412	1415	1427	1389	1413	1420	1421	1425	1418	1424	1440	1454
Glicerol	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoza	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ksiloza	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -metil-ksilozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	-	-	-	-
D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manoza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorboza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inozitol	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-manozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobioza	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoza	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibioza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saharoza	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloza	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinoza	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\checkmark$ krob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -gentiobioza	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-liksoza	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Rezultati testa API 50 CH (BioMerieux).

	<i>J. agaricidamnosum</i>	<i>J. lividum</i>	<i>J. svalbardensis</i>	1516	1423	1477	1506	1511	1458	1462	1509	1579	1580	1645	1394	1419
Glicerol	+	+	+	++	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -metil-ksilozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	-	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
D-glukoza	+	+	+	-	+	+	++	++	+	+	++	+	+	++	++	++
D-fruktoza	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
D-manoza	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
L-sorboza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inozitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-manozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl glukozamin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobioza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoza	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibioza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saharoza	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloza	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -gentiobioza	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-liksoza	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Rezultati testa API 50 CH (BioMerieux).

	<i>J. agaricidamnosum</i>	<i>J. lividum</i>	<i>J. svalbardensis</i>	1428	1640	1648	1656	1455	1457	1476	1491	1504	1533	1534	1488	1535
Glicerol	+	+	+	++	++	++	+	+	++	++	+	+	++	++	++	++
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
L-arabinoza	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -metil-ksilozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	-	+	+	+	++	+	+	+	+	++	++	+	+	++	++	++
D-glukoza	+	+	+	++	++	+	++	++	++	-	++	+	-	++	+	+
D-fruktoza	+	+	+	+	++	++	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
D-manoza	+	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-sorboza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inozitol	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-manozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobioza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoza	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Laktoza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Melibioza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saharoza	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloza	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -gentiobioza	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-likzoza	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

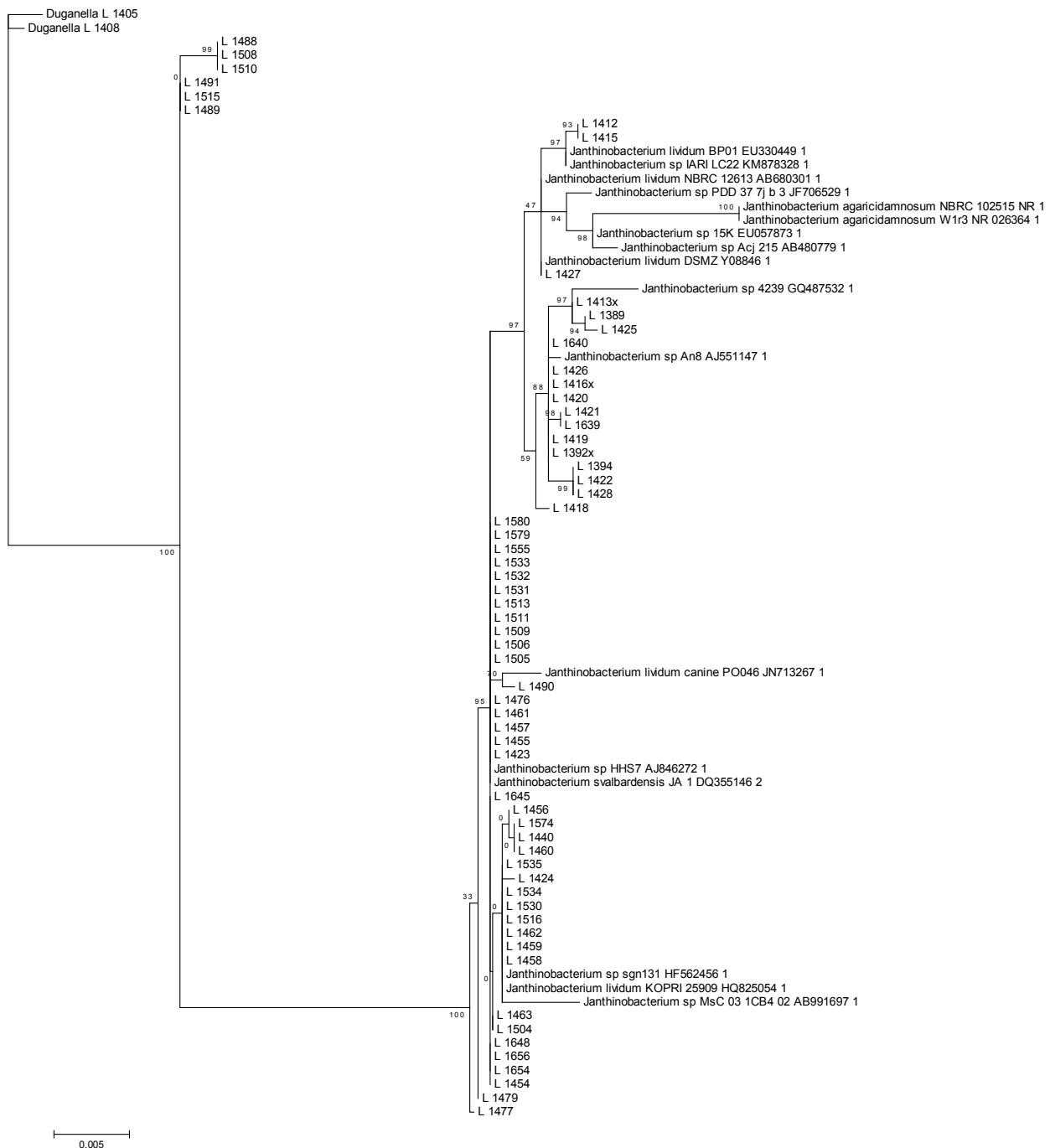
se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Rezultati testa API 50 CH (BioMerieux).

	<i>J. agaricidamnosum</i>	<i>J. lividum</i>	<i>J. svalbardensis</i>	1555	1574	1654	1460	1531	1416	1422	1490	1513	1515	1639
Glicerol	+	+	+	++	++	+	+	++	-	-	-	++	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	++	++	++	++	-	-	-	++	-	++	-
L-arabinoza	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	-
Ribosa	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-ksiloza	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -metil-ksilozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	-	+	+	++	+	++	+	++	-	++	+	++	++	-
D-glukoza	+	+	+	++	++	++	++	++	-	++	+	++	++	++
D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D-manoza	+	+	+	+	+	++	+	++	-	-	-	+	-	-
L-sorboza	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inozitol	+	+	+	++	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Manitol	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
$\alpha$ -metil-D-manozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Amigdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobioza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoza	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-
Laktoza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibioza	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Saharoza	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehaloza	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Melezitoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -gentiobioza	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-liksoza	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-arabitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.8 FILOGENETSKA ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ GENA ZA 16S rRNA IZOLATOV RODU *Janthinobacterium*

Filogenetske odnose preučevanih izolatov rodu *Janthinobacterium*, kjer smo kot filogenetski označevalec uporabili zaporedje gena za 16S rRNA, smo prikazali v filogenetskem drevesu (slika 10), vrsti rodu *Duganella* sta bili uporabljeni kot zunanjik (outgroup). V poravnavo smo iz podatkovne zbirke GenBank (18. 8. 2015) vključili izbrana dostopna delna nukleotidna zaporedja gena za 16S rRNA vrst rodu *Janthinobacterium*: *Janthinobacterium agaricidamnosum* (NR\_026364.1), *J. agaricidamnosum* (NR\_114134.1), *Janthinobacterium lividum* (AB680301.1), *J. lividum* (Y08846.1), *J. lividum* (EU330449.1), *J. lividum* (JN713267.1), *J. lividum* (HQ825054.1), *Janthinobacterium svalbardensis* (DQ355146.2), *Janthinobacterium* sp. (AJ846272.1), *Janthinobacterium* sp. (AB991697.1), *Janthinobacterium* sp. (HF562456.1), *Janthinobacterium* sp. (AJ551147.1), *Janthinobacterium* sp. (GQ487532.1), *Janthinobacterium* sp. (KM878328.1), *Janthinobacterium* sp. (JF706529.1), *Janthinobacterium* sp. (AB480779.1), *Janthinobacterium* sp. (EU057873.1). Na osnovi zaporedja gena za 16S rRNA naših izolatov ne moremo zanesljivo taksonomsko uvrstiti v posamezno vrsto. Ozko sorodne vrste *J. svalbardensis*, *J. lividum*, *J. agaricidamnosum* ter njim ozko sorodni sevi, v podatkovnih zbirkah označeni kot *Janthinobacterium* sp., se namreč razlikujejo le v 22 nukleotidnih mestih od skupno 1136-ih, če iz poravnave odstranimo zaporedja vrste *J. agaricidamnosum*, pa le še v 14 nukleotidnih mestih.



Slika 21: Filogenetsko drevo preučevanih izolatov rodu *Janthinobacterium* in *Duganella*.

## 5 RAZPRAVA

Ledeniki predstavljajo skrajno okolje, za katerega so značilne nizke temperature, pomanjanje hranil in tekoče vode, visoki osmotski in hidrostatični pritiski ter povisano UV sevanje. Kljub neugodnim življenjskim razmeram najdemo tu specializirane biotske združbe, ki so razvile vrsto prilagoditev (Rothschild in Mancinelli, 2001; Miteva, 2008). V našem raziskovalnem delu smo proučevali bakterijske mikrobne združbe gorskih ledenikov Grinnell (Montana, ZDA) in Rhone (Valais, Švica). V prvem delu smo se osredotočili na izolacijo in identifikacijo gojljivih aerobnih heterotrofnih bakterij in pri izbranih sevih ugotavljali odpornost proti devetim različnim antibiotikom, ter kardinalne temperature rasti. V drugem delu smo se osredotočili predvsem na izbrane seve iz rodu *Janthinobacterium*, pri katerih smo določili sposobnost produkcije signalnih molekul in sposobnost razgradnje različnih sladkorjev z API 50 CH testom, primerjali absorpcijske spektre izoliranih pigmentov ter naredili filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij gena za 16S rRNA.

Predpostavili smo, da se bodo bakterijske združbe obeh ledenikov med seboj razlikovale, saj sta ledenika geografsko zelo oddaljena. Poleg tega smo pričakovali razlike med vzorci iz notranjosti in zunanjosti ledenika, ter vzorci izcedne vode.

Kot najboljše gojišče za izolacijo bakterij iz ledenikov se je izkazalo gojišče R2A, na katerem je v povprečju zraslo največ kolonij (slika 6) in so ga uporabili tudi pri drugih, podobnih raziskavah bakterij v ledenikih. Razvili so ga za izolacijo bakterij iz pitne vode. Vsebuje namreč malo hranil ter je primeren za inkubacijo pri nizkih temperaturah in za dolg inkubacijski čas. Hitro rastoče bakterije tako ne prerastejo počasi rastih, ki jih je v pitni vodi in ledenikih veliko (Reasoner in Geldreich, 1985). Kot dobro gojišče se je izkazal tudi HA. Na gojišču M9 pa so zaradi zelo nizke koncentracije hranil kolonije rasle počasi in niso dosegle enakih velikosti, kot na gojiščih R2A in HA.

Število bakterij v čistem ledu je največkrat med  $10^2$  -  $10^4$  ml<sup>-1</sup>, njihovo število se veča glede na prisotnost netopnih mineralnih delcev (Abyzov in sod. 1998), s čimer so se ujemali tudi naši rezultati. V testiranih vzorcih ledu ledenika Grinnell je bilo pri temperaturah 4 °C in 15 °C na gojišču R2A, med 13.000 in 24.000 CFU/ ml in v vzorcih ledenika Rhone med 2.050 in 20.000 CFU/ ml (slika 6). Velike razlike med posamičnimi vzorci so bile zato, ker so bili vzorci odvzeti na različnih delih ledenikov. Več bakterij je bilo v vzorcih ledu, ki so bili izpostavljeni zunanjosti. Ti so namreč vsebovali več netopnih delcev, poleg tega so bili izpostavljeni dejavnikom, ki lahko prinesejo mikroorganizme od drugod.

Povprečno število zraslih bakterij je bilo višje v vzorcih ledenika Grinnell kot ledenika Rhone (slika 6). Razlog je v tem, da so bili trije izmed petih vzorcev ledu ledenika

Rhone iz notranjosti ledenika, kjer je bakterij v povprečju manj, saj ni kontaminacije z bakterijami, ki jih lahko na zunanje dele ledenika zanesajo zračne mase (Segawa in sod., 2013, Ushida in sod., 2010) ter ptice (Sjölund in sod., 2008). Vzorci ledu ledenika Grinnell pa so izhajali s površine ledenika. V vzorcu izcedne vode ledenika Rhone in v vzorcu ledeniškega jezera ledenika Grinnell, je bilo število CFU/ ml manjše kot v vzorcih ledu iz obeh ledenikov (slika 6). Pričakovali smo ravno obratno, saj se z oddaljevanjem od ledu potencialno veča količina hranilnih snovi, predvsem na račun živalskih iztrebkov in odpadkov. Poleg tega je temperatura ledeniških jezer višja od ledenikov, kar prav tako stimulira rast mikroorganizmov (Mindl in sod., 2007). Razlog, da je bilo v vzorcih ledu večje število CFU/ ml bi lahko bil tudi to, da so bile v vzorcih, vzetih s površine ledenikov, prisotne kriokonitne luknje. V njih je povečano število mikroorganizmov zaradi vode, ki je v tekoči obliki in zaradi kopiranja organskega materiala (Takeuchi in sod., 2001; Margesin in sod., 2002).

Eden izmed ciljev naše naloge je bil proučiti odpornost izolatov proti izbranim antibiotikom. V več študijah so dokazali, da so bakterije, izolirane iz ledenikov, precej odporne proti različnim antibiotikom (Ball in sod., 2014), kar smo potrdili tudi z našimi rezultati (slika 11; priloga B). Izmed 217 testiranih sevov, je bila večina odpornih proti  $\beta$ -laktamskim antibiotikom pri izbranih koncentracijah, to so ampicilin, imipenem, ertapenem in cefotaksim, ki so zaradi nizke toksičnosti široko uporabljeni (Madigan in sod., 2009). Zelo velika odpornost se je pokazala tudi v primeru eritromicina in nekoliko manjša, vendar še zmeraj visoka pri kloramfenikolu, kanamicinu in ciprofloxacinu pri uporabljenih koncentracijah. Proti tetraciklinu ni bil odporen noben izolat, najbrž je razlog tudi v visoki koncentraciji tega antibiotika v gojišču. Opazen je pojav odpornosti proti več antibiotikom hkrati, kajti večina izolatov je bila odporna na dva ali več antibiotikov. Ti rezultati potrjujejo, da je odpornost proti antibiotikom prisotna pri bakterijah tudi na izoliranih območjih, kjer naj človeškega vpliva ne bi bilo. Odpornost proti antibiotikom bi lahko bila povezana z zmanjšano prepustnostjo celične stene, ekspresijo genov, ki kodirajo črpalke za odstranitev večih antibiotikov in horizontalnim prenosom genov za rezistence med predstavniki naravnih združb (Summers, 2002; Baker-Austin in sod., 2006; Hogan in Kolter 2009). Poleg tega je odpornost na več antibiotikov hkrati in prisotnost mobilnih genetskih elementov pogosta med naravnimi združbami psihrofilnih bakterij in sega mnogo pred uporabo komercialnih antibiotikov (Petrova in sod., 2009).

V ledu so temperature ves čas pod lediščem, zaradi česar najdemo tu večinoma psihofile in psihrotrofe (Miteva, 2008). V našem poskusu je po pričakovanju bistveno več bakterij zraslo pri 4 °C in 15 °C (psihofili in psihrotrofi) kot pri 30 °C (slika 6 in 13; priloga B). Vse mezofilne bakterije smo izolirali iz vzorcev, ki so bili izpostavljeni zunanjim dejavnikom, iz česar smo sklepali, da izvirajo iz toplejših območij, od koder so prišle preko atmosferskega kroženja (Ushida in sod., 2010; Segawa in sod., 2013).

Možen je tudi prenos z iztrebki ptic selivk (Sjölund in sod., 2008). V skladu s tem so se pojavile tudi razlike pri naših vzorcih, in sicer število zraslih bakterij pri 30 °C je bilo večje v vzorcih ledu, ki so bili vzeti s površine ledenikov, kot v vzorcih iz notranosti ledenika.

V preiskovanih ledenikih smo identificirali največ bakterij iz rodu *Janthinobacterium* (slika 7 in 8). V ledeniku Grinnell so predstavljale 32 odstotkov celotne združbe identificiranih bakterij, v ledeniku Rhone pa 63 odstotkov. V obeh ledenikih so predstavljale velik delež tudi bakterije iz rodu *Pseudomonas*, v ledeniku Grinnell pa še iz rodov *Flavobacterium* in *Duganella*. Slednje najdemo tudi v filosferi in rizosferi (Aranda in sod., 2011; Rastogi in sod., 2012). Iz ledenika Grinnell smo identificirali 14 različnih rodov bakterij, iz ledenika Rhone pa 24. Najpogosteje identificirane gojljive aerobne heterotrofne bakterije iz ledenikov po svetu so iz rodov *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Exiguobacterium*, *Frigoribacterium*, *Janthinobacterium*, *Methylobacterium*, *Rhodococcus* in *Sphingomonas* (Miteva, 2008), od katerih v našem delu nismo našli predstavnikov iz rodov *Acinetobacter*, *Frigoribacterium* in *Methylobacterium*.

Opazne so tudi razlike v bakterijski sestavi med vzorci zunanjega in notranjega ledu ter ledeniške vode (slika 9 in 10). Najvišja pestrost bakterij je v vzorcih, vzetih s površine ledenikov. Tam je poleg prisotnosti kriokonitnih lukenj, polnih hranilnih snovi (Takeuchi in sod., 2001; Margesin in sod., 2002), vzrok za višjo pestrost tudi izpostavljenost. Zračne mase lahko odložijo bakterije od drugod na površino ledenikov (Segawa in sod., 2013, Ushida in sod., 2010). Poleg tega je zelo malo vrst, ki smo jih našli v vseh različnih delih ledenika. Ledeniška voda, notranji in zunanji led namreč predstavljajo različna okolja, v katerih uspevajo različne vrste bakterij.

Med ledenikoma se je razlikoval tudi Shannon-Wienerjev izračunan diverzitetni indeks, ki je v primeru ledenika Grinnell  $H' = 1,88$  in v primeru ledenika Rhone  $H' = 1,32$ . Slednji je imel kar 63 odstotni delež ene vrste, zaradi česar je diverzitetni indeks manjši. Dobljena diverzitetna indeksa sta manjša kot jih navaja literatura, kjer so navedeni indeksi tudi  $H' = 4$  (Liu in sod., 2009; Simon in sod., 2009; Larose in sod., 2010), vendar so ti izračunani iz podatkov klonskih knjižnic, kjer so zajete tudi negojljive bakterije.

Nekatere bakterije se med seboj sporazumevajo preko signalnih molekul, kot so homoserin laktoni pri po Gramu negativnih bakterijah. Zanimalo nas je, če je komunikacija prisotna tudi v hladnem skrajnostnem okolju, kjer je količina hranil in gostota celic manjša kot v običajnih habitatih. Od preiskovanih sevov iz rodu *Janthinobacterium* in *Duganella* je samo en sev iz rodu *Janthinobacterium* produciral

signalne molekule, ki so v indikatorskemu sevu *Chromobacterium violaceum* CV026, sprožile sintezo vijoličnega pigmenta violaceina (slika 15).

Nekateri sevi vrste *Janthinobacterium lividum* sintetizirajo vijoličen pigment violacein, ki kolonije obarva temno vijolično (Kim in sod., 2012; Gillis in De Ley, 2006). Sintesa violaceina je odvisna od vira ogljika, glukoza jo namreč zavira, glicerol pa okrepi (Pantanella in sod., 2006). V našem poskusu večina izoliranih sevov iz rodu *Janthinobacterium* ni producirala violaceinu podobnega pigmenta, vijolično obarvanost kolonij smo opazili pri le štirih sevih, kar bi lahko pripisali tudi odsotnosti glicerola v uporabljenih gojiščih in prisotnosti glukoze v gojišču R2A. Ker so imeli vsi vijolični pigmenti, ki smo jih izolirali, enako kot violacein, absorpcijski maksimum pri približno 580 nm, ko so bili raztopljeni v etanolu (slika 16), v 10-odstotni žveplovi kislini v etanolu pa so spremenili barvo v zeleno in so imeli absorpcijski maksimum pri 700 nm (slika 17), smo sklepali, da je ta pigment violacein (Johnson and Beer, 1971, cit. po Gillis in De Ley, 2006). V poskus smo vključili tudi dva seva iz rodu *Duganella*, ki tvorita rumen pigment. Ta pigment ima raztopljen v etanolu, absorpcijski maksimum pri 450 nm (slika 18), raztopljen v 10-odstotni žveplovi kislini v etanolu pa pri 425 nm (slika 19). V literaturi je navedeno, da nekateri sevi vrste *D. zoogloeoides* producirajo rumen pigment (Li in sod., 2004). Na podlagi tega smo sklepali, da bi lahko šlo za vrsto *D. zoogloeoides*.

Iz ledenikov smo izolirali veliko sevov *Janthinobacterium* sp.. S pomočjo testov API 50 CH (BioMerieux) in znanih rezultatov za vrste *J. agaricodamnosum*, *J. lividum* in *J. svalbardensis* (Hovnik, 2005) smo poskušali določiti, kateri vrsti pripadajo (preglednica 2). Na podlagi naših rezultatov, ki se zelo razlikujejo od rezultatov v literaturi, nismo mogli z gotovostjo trditi, kateri vrsti pripadajo. Vendar smo iz rezultatov predvidevali, da testirani izolati spadajo v vrsto *J. lividum* ali *J. agaricodamnosum*. Rezultati izolatov, ki so tvorili vijoličen pigment violacein, značilen za vrsto *J. lividum*, se prav tako niso povsem ujemali s podatki v literaturi. Razlog je verjetno v tem, da je bilo zaradi prisotnosti violaceina odčitavanje rezultatov oteženo. Tudi na osnovi zaporedja gena za 16S rRNA jih nismo mogli zanesljivo taksonomsko uvrstiti v posamezno vrsto (slika 21).

Cilj našega dela je bil predvsem izolacija in identifikacija aerobnih kemoheterotrofnih bakterij iz ledenikov ter njihova fiziološka in biokemijska karakterizacija, vključno z določanjem njihove odpornosti proti antibiotikom. Pozitivna stran pridobivanja izolatov v primerjavi z metagenomiko je v tem, da izoliramo žive mikroorganizme, ki jih lahko nato podrobno morfološko, fiziološko, biokemijsko in molekularno biološko okarakteriziramo. Ocenimo lahko tudi število gojljivih aerobnih kemoheterotrofnih bakterij in delež posameznih vrst bakterij v vzorcih. Ne zaznamo pa negojljivih in propadlih bakterij. Poleg naštetege smo ugotovili tudi, da so bakterije, izolirane iz

ledenikov, zelo odporne proti različnim antibiotikom. Zaradi taljenja ledenikov namreč prehajajo v okolje kjer bi lahko predstavljale potencialno tveganje za ljudi, živali in rastline, zaradi širjenja genov za rezistenco proti antibiotikom in njihove potencialne patogenosti.

## 6 SKLEPI

- Bakterijske združbe ledenikov Grinnell in Rhone se med seboj razlikujejo.
- V različnih delih ledenikov je različno število kolonijskih enot na mililiter vzorca. Največ bakterij je bilo v vzorcih vzetih s površine ledenikov, kamor bakterije lahko prinesejo zračne mase iz oddaljenih območij ter ptice. Oba ledenika sta dosegljiva za ljudi, zato bi lahko kot prenašalec služil tudi človek. Poleg tega so na površini ledenikov prisotne kriokonitne luknje, v katerih so ugodni pogoji za rast bakterij.
- Pestrost bakterijskih vrst je višja na zunanjih delih ledenikov, kamor lahko zračne mase ter ptice prinesejo bakterije iz oddaljenih območij.
- Največje deleže bakterijske združbe ledenika Grinnell predstavljajo bakterije iz rodov *Janthinobacterium*, *Flavobacterium* ter *Pseudomonas*, ledenika Rhone pa *Janthinobacterium* in *Pseudomonas*.
- Bakterije v ledenikih so odporne proti antibiotikom. Opazna je odpornost proti več antibiotikom hkrati. Izmed testiranih antibiotikov je bila največja odpornost proti ampicilinu (50 mg/l), ertapenemu (0,5 mg/l), eritromicinu (15 mg/l) in cefotaksimu (2 mg/l).
- Večina bakterij v ledenikih spada med psihrofile in psihrotrofe. Deli ledenikov, ki so izpostavljeni zunanjosti, vsebujejo tudi mezofilne bakterije, tja so najverjetneje prišle iz toplejših območij preko zračnih mas ter ptic.
- Samo en testirani sev iz rodu *Janthinobacterium* lahko sintetizira molekule za celično sporazumevanje (quorum sensing), podobne homoserin laktonom, ki jih sintetizira *Chromobacterium violaceum*.
- Nekateri sevi iz rodu *Janthinobacterium* producirajo violaceinu podoben pigment, sevi iz rodu *Duganella* pa nedoločen rumen pigment.
- Na osnovi rezultatov API testa in primerjave zaporedij gena za 16S rRNA smo dokazali, da izolirani sevi iz rodu *Janthinobacterium* ne pripadajo isti vrsti. Nismo pa jih mogli s pomočjo teh rezultatov zanesljivo taksonomsko uvrstiti v posamezno vrsto.

## 7 POVZETEK

Zaradi globalnega segrevanja se ledeniki v zadnjem času pospešeno talijo, zaradi česar v okolje prehajajo mikroorganizmi, ki so se tisočletja razvijali v stabilnem in izoliranem okolju. To predstavlja potencialno tveganje za ljudi, živali in rastline, zaradi širjenja morebitnih patogenov in genov za virulentne dejavnike (kot so rezistence proti antibiotikom).

Iz vzorcev ledu in vode ledenikov Grinnell (Montana, ZDA) in Rhone (Valais, Švica) smo izolirali in identificirali 278 izolatov. Bakterijske združbe obeh ledenikov so se med seboj razlikovale, v obeh pa je večinski delež predstavljal rod *Janthinobacterium*. Razlike v sestavi bakterijskih združb so se pojavile tudi med vzorci, vzetimi iz različnih delov ledenikov. Poleg tega so vzorci iz notranjosti ledenikov vsebovali manjše število CFU/ ml kot vzorci iz površinskih delov, kamor lahko mikroorganizme od drugod prinesejo zračne mase ali živali. Na podlagi kardinalnih temperatur izolatov, smo večino uvrstili med psihrotrofe, manjši delež pa med psihrofile in mezofile. Vsi izolati, ki smo jih uvrstili med mezofile so bili izolirani iz vzorcev, vzetih s površine ledenikov in izcedne vode, kjer je možna kontaminacija z bakterijami iz drugih, toplejših območij.

Pomemben del naše naloge je bilo proučevanje odpornosti proti izbranim antibiotikom. Izkazalo se je, da je večina izolatov odporna proti vsaj enemu izmed testiranih antibiotikov. Opazen je tudi pojav odpornosti proti večim antibiotikom hkrati, kar je najverjetneje posledica prenosa genov za odpornost s plazmidi.

V drugem delu smo se osredotočili predvsem na izbrane izolate iz rodu *Janthinobacterium*. Izmed 50 testiranih sevov smo le pri enem dokazali sintezo signalnih molekul, podobnih homoserin laktonom, ki sodelujejo v medceličnem sporazumevanju bakterije *Chromobacterium violaceum*. Pri štirih izolatih smo opazili produkcijo vijoličnega pigmenta. Z določitvijo absorpcijskih spektrov izoliranih pigmentov smo domnevali, da gre za violacein, ki je značilen za vrsto *Janthinobacterium lividum*. Na osnovi rezultatov API testa in zaporedja gena za 16S rRNA smo dokazali, da izolirani sevi ne pripadajo isti vrsti rodu *Janthinobacterium*, nismo pa jih mogli zanesljivo taksonomsko uvrstiti v posamezno vrsto.

## 8 VIRI

- Abyzov S. S., Barkov N. I., Bobin N. E., Koudryashov B. B., Lipenkov V. Y., Mitskevich I. N., Pashkevich V. M., Poglazova M. N. 1998. The ice sheet of central Antarctica as an object of study of past ecological events on the earth. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*, 5: 610-616
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 17: 3389-3402
- Ambrožič Avguštin J., Žgur Bertok D., Kostanjšek R., Avguštin G. 2013. Isolation and characterization of a novel violacein-like pigment producing psychrotrophic bacterial species *Janthinobacterium svalbardensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 4: 763-769
- Andersson D. I. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 5: 452-456
- Andreassen L. M., Winsvold S. H., Paul F., Hausberg J. E. 2012. Inventory of Norwegian glaciers. Oslo, Norwegian Water Resources and Energy Directorate: 236 str.
- Aranda S., Montes-Borrego M., Landa B. B. 2011. Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. *Microbial Ecology*, 62, 2: 446-459
- Asencio G., Lavin P., Alegría K., Domínguez M., Bello H., González-Rocha G., González-Aravena M. 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 1: 1-5
- Baker-Austin C., Wright M. S., Stepanauskas R., McArthur J. V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14, 4: 176-182
- Ball M. M., Gómez W., Magallanes X., Rosales R., Melfo A., Yarzábal L. A. 2014. Bacteria recovered from a high-altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 3: 931-941

- Beales N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3,1: 1-20
- Belousova N. I., Baryshnikova L. M., Shkidchenko A. N. 2002. Selection of microorganisms capable of degrading petroleum and its products at low temperatures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38, 5: 437-440
- Berry E. D., Foegeding P. M. 1997. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection*, 12: 1478-1617
- BLAST. 2014. Bethesda, NCBI-National Center for Biotechnology Information  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (3. jul. 2014)
- Blosser R. S., Gray K. M. 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 1: 47-55
- Brucker R. M., Harris R. N., Schwantes C. R., Gallaher T. N., Flaherty D. C., Lam B. A., Minbile K. P. C. 2008. Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 11: 1422-1429
- Champney W. S. 2003. Bacterial ribosomal subunit assembly is an antibiotic target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3: 929-947
- Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G., Zagorodnov V., Sandman K., Reeve J. N. 2000. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus*, 144, 2: 479-485
- Choi S. Y., Kim S., Lyuck S., Kim S. B., Mitchell R. J. 2015. High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 5: 15598-15609
- Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232-260

- Cole J. R., Wang Q., Fish J. A., Chai B., McGarrell D. M., Sun Y., Brown C. T., Porras-Alfaro A., Kuske C. R., Tiedje J. M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, D1, doi: 10.1093/nar/gkt1244: D633-D642
- Cuffey K. M., Paterson W. S. 2010. The physics of glaciers. 4<sup>th</sup> ed. Burlington, Butterworth-Heinemann Publications: 704 str.
- Eneroth A., Ahrne S., Molin G. 2000. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal*, 10: 325-331
- García-Echauri S. A., Gidekel M., Gutiérrez-Moraga A., Santos L., De León-Rodríguez A. 2011. Isolation and phylogenetic classification of culturable psychrophilic prokaryotes from the Collins glacier in the Antarctica. *Folia Microbiologica*, 56, 3: 209-214
- Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa J. P., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georlette D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis M. A., Feller G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18, 3: 103-107
- Gibbs S. G., Green C. F., Tarwater P. M., Mota L. C., Mena K. D., Scarpino P. V. 2006. Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environmental Health Perspectives*, 114, 7: 1032-1037
- Gillis M., De Ley J. 2006. The genera *Chromobacterium* and *Janthinobacterium*. The Prokaryotes, 5: 737-746
- Goehring B. M., Schaefer J. M., Schluechter C., Lifton N. A., Finkel R. C., Jull A. T., Akcar N., Alley R. B. 2011. The Rhone glacier was smaller than today for most of the Holocene. *Geology*, 39, 7: 679-682
- Graupner K., Scherlach K., Bretschneider T., Lackner G., Roth M., Gross H., Hertweck C. 2012. Imaging mass spectrometry and genome mining reveal highly antifungal virulence factor of mushroom soft rot pathogen. *Angewandte Chemie International Edition*, 51, 52: 13173-13177

- Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, 3: 307-321
- Hall M. H., Fagre D. B. 2003. Modeled climate-induced glacier change in Glacier National Park, 1850–2100. *BioScience*, 53, 2: 131-140
- Hogan D., Kolter R. 2009. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Contributions to Science*, 5, 1: 85-90
- Hovnik T. 2005. Identifikacija bakterijskih sevov iz arktičnega ledu in ugotavljanje prisotnosti nekaterih genetskih lastnosti pri teh sevih. Diplomsko delo. Ljubljana, Oddelek za biologijo: 67 str.
- Huang J. P., Hoover R. B., Swain A., Murdock C., Andersen D. T., Bej A. K. 2010. Comparison of the microbial diversity and abundance between the freshwater land-locked lakes of Schirmacher Oasis, and the perennially ice-covered Lake Untersee in East Antarctica. *Proceedings of SPIE*, 7819: doi 10.1117/12.863131: 9 str.
- Ivy-Ochs S., Kerschner H., Maisch M., Christl M., Kubik P. W., Schlüchter C. 2009. Latest Pleistocene and Holocene glacier variations in the European Alps. *Quaternary Science Reviews*, 28, 21-22: 2137-2149
- Katoh K., Toh H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9, 4: 286-298
- Kämpfer P., Wellner S., Lohse K., Martin K., Lodders N. 2012. *Duganella phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Trifolium repens* and proposal to reclassify *Duganella violaceinigra* into a novel genus as *Pseudoduganella violaceinigra* gen. nov., comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 1: 19-23
- Key C. H., Fagre D. B., Menicke R. K. 2002. Glaciers of the conterminous United States: Glacier retreat in Glacier National Park, Montana. V: Satellite image atlas of glaciers of the world. Williams R. S. Jr., Ferrigno J. G. (ur.). Washington, US Geological Survey Professional Paper: 365-375
- Kim S. J., Shin S. C., Hong S. G., Lee Y. M., Lee H., Lee J., Choi I., Park, H. 2012. Genome sequence of *Janthinobacterium* sp. strain PAMC 25724, isolated from alpine glacier cryoconite. *Journal of Bacteriology*, 194, 8: 2096–2096

- Larose C., Berger S., Ferrari C., Navarro E., Dommergue A., Schneider D., Vogel T. M. 2010. Microbial sequences retrieved from environmental samples from seasonal Arctic snow and meltwater from Svalbard, Norway. *Extremophiles*, 14, 2; 205-212
- Lashof D. A., Ahuja D. R. 1990. Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming. *Nature*, 344: 529-531
- Levy S. B., Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, 1: S122-S129
- Li W. J., Zhang Y. Q., Park D. J., Li C. T., Xu L. H., Kim C. J., Jiang C. L. 2004. *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 5: 1811-1814
- Lincoln S. P., Fermor T. R., Tindall, B. J. 1999. *Janthinobacterium agaricidamnosum* sp. nov., a soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 4: 1577-1589
- Liu Y., Yao T., Jiao N., Kang S., Xu B., Zeng Y., Huang S., Liu X. 2009. Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers. *Extremophiles*, 13, 3: 411-423
- Livermore D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 1: S11-S23
- Logan N. A., Moss M. O. 1992. Identification of *Chromobacterium*, *Janthinobacterium* and *Iodobacter* species. V: Identification methods in applied and environmental microbiology. Board R. G., Jones D., Skinner F. A. (ur.). Oxford, Wiley-Blackwell: 83-92
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Saravanan V. S., Hari K., Lee K.-C., Lee J.-S. 2013. *Duganella sacchari* sp. nov. and *Duganella radicis* sp. nov., two novel species isolated from rhizosphere of field-grown sugar cane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3: 1126-1131
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P., 2009. Brock biology of microorganisms. 12<sup>th</sup> ed. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 1061 str.
- MAFFT 7. 2014. Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences. Japan, CBRC-Computational Biology Research Consortium  
<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software> (29.12.2015)

Margesin R., Zacke G., Schinner F. 2002. Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryoconite. Arctic, Antarctic, and Alpine Research, 34, 1: 88-93

Mazur P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. Journal of General Physiology, 47, 2: 347-369

Methe B. A., Nelson K. E., Deming J. W., Momen B., Melamud E., Zhang X., Moult J., Madupu R., Nelson W. C., Dodson R. J., Brinkac L. M., Daugherty S. C., Durkin A. S., DeBoy R. T., Kolonay J. F., Sullivan S. A., Zhou L., Davidsen T. M., Wu M., Huston A. L., Lewis M., Weaver B., Weidman J. F., Khouri H., Utterback T. R., Feldblyum T. V., Fraser C. M. 2005. The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 10913-10918

Miller M. B., Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annual Reviews in Microbiology, 55, 1: 165-199

Mindl B., Anesio A. M., Meirer K., Hodson A. J., Laybourn-Parry J., Sommaruga R., Sattler B. 2007. Factors influencing bacterial dynamics along a transect from supraglacial runoff to proglacial lakes of a high Arctic glacier: Bacterial dynamics in a glacial environment. FEMS Microbiology Ecology, 59, 2: 307-317

Miteva V. I., Sheridan P. P., Brenchley J. E. 2004. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. Applied and Environmental Microbiology, 70, 1: 202-213

Miteva V. 2008. Bacteria in snow and glacier ice. V: Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Margesin R. (ur.). Pennsylvania, Springer: 31-50

Morita R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. Bacteriological Reviews, 39, 2: 144-167

Moyer C. L., Morita R. Y. 2007. Psychrophiles and psychrotrophs. V: Encyclopedia of life sciences. Chichester, John Wiley & Sons:  
doi: 10.1002/9780470015902.a0000402.pub2: 6 str.

Muldrew K., McGann L. E. 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. Biophysical Journal, 57, 3: 525-532

- Nichols D., Bowman J., Sanderson K., Nichols C. M., Lewis T., McMeekin T., Nichols P. D. 1999. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Biotechnology*, 10: 240-246
- Pantanella F., Berluttì F., Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S. 2006. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 992-999
- Petrova M., Gorlenko Z., Mindlin S. 2009. Molecular structure and translocation of a multiple antibiotic resistance region of a *Psychrobacter psychrophilus* permafrost strain. *FEMS Microbiology Letters*, 296, 2: 190-197
- Posada D., Crandall K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818
- Post A., Lachapelle E. R. 2000. Glacier ice. Revised ed. Toronto, University of Toronto Press, copublished with the International Glaciological Society: 145 str.
- Price P. B. 2007. Microbial life in glacier ice and implications for a cold origin of life. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 2: 217-231
- Price P. B., Sowers T. 2004. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13: 4631-4636
- Price P. B., Nagornov O. V., Bay R., Chirkin D., He Y., Miocinovic P., Richards A., Woschnagg K., Koci B., Zagorodnov V. 2002. Temperature profile for glacial ice at the South pole: Implications for life in a nearby subglacial lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 7844-7847
- Priscu J. C., Christner B. C., Foreman C. M., Royston-Bishop G. 2006. Biological material in ice cores. V: *Encyclopedia of quaternary sciences*. Vol. 2. Elias S. A. (ur.). Amsterdam, Elsevier Science: 1156-1166
- Raper S. C. B., Braithwaite, R. J. 2006. Low sea level rise projections from mountain glaciers and icecaps under global warming. *Nature*, 439: 311-313
- Rastogi G., Sbodio A., Tech J. J., Suslow T. V., Coaker G. L., Leveau J. H. 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME Journal*, 6, 10: 1812-1822

- Reasoner D. J., Geldreich E. E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1: 1-7
- Rossolini G. M., Condemi M. A., Pantanella F., Docquier J. D., Amicosante G., Thaller M. C. 2001. Metallo-β-lactamase producers in environmental microbiota: New molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3: 837-844
- Rothschild L. J., Mancinelli R. L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409: 1092-1101
- Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 5: 1109-1117
- Russell N. J. 1998. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 61: 1-21
- Salmond G. P., Bycroft B. W., Stewart G. S., Williams P. 1995. The bacterial “enigma”: cracking the code of cell-cell communication. *Molecular Microbiology*, 16, 4: 615-624
- Sanchez L. M., Dorrestein P. C. 2013. Analytical chemistry: Virulence caught green-handed. *Nature Chemistry*, 5, 3: 155-157
- Schloss P. D., Allen H. K., Klimowicz A. K., Mlot C., Gross J. A., Savengsuksa S., McEllin J., Clardy J., Ruess R. W., Handelsman J. 2010. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA and Cell Biology*, 29, 9: 533–541
- Schroeder R., Waldsch C., Wank H. 2000. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *The EMBO Journal*, 19, 1: 1-9
- Segawa T., Takeuchi N., Rivera A., Yamada A., Yoshimura Y., Barcaza G., Shinbori K., Motoyama H., Kohshima S., Ushida K. 2013. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments: Antibiotic resistance genes in snow and ice. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 1: 127-134

- Shivaji S., Ray M. K., Kumar G. S., Reddy G. S. N., Saisree L., Wynn-Williams D. D. 1991. Identification of *Janthinobacterium lividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic peninsula. *Polar Biology*, 11, 4: 267-271
- Siddiqui K. S., Cavicchioli R. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 75: 403–433
- Simon C., Wiezer A., Strittmatter A. W., Daniel R. 2009. Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 23: 7519-7526
- Sjölund M., Bonnisdahl J., Hernandez J., Bengtsson S., Cederbrant G., Pinhassi J., Kahlmeter G., Olsen B. 2008. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1: 70-72
- Steindler L., Venturi V. 2007. Detection of quorum-sensing N -acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 266, 1: 1-9
- Stibal M., Tranter M., Benning L. G., Rehak, J. 2008. Microbial primary production on an Arctic glacier is insignificant in comparison with allochthonous organic carbon input. *Environmental Microbiology*, 10, 8: 2172-2178
- Summers A. O. 2002. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 3: 85-92
- Takeuchi N., Kohshima S., Seko K. 2001. Structure, formation, and darkening process of albedo-reducing material (cryoconite) on a Himalayan glacier: A granular algal mat growing on the glacier. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 33, 2: 115-122
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 12: 2725-2729
- Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 330, 5: 1005-1014
- Thompson J., O'Connor M., Mills J. A., Dahlberg A. E. 2002. The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *Journal of Molecular Biology*, 322, 2: 273-279

Todar K. 2006. Overview of bacteriology. Online textbook of bacteriology.  
[www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net) (15.9.2015)

Ushida K., Segawa T., Kohshima S., Takeuchi N., Fukui K., Li Z., Kanda H. 2010.  
Application of real-time PCR array to the multiple detection of antibiotic resistant  
genes in glacier ice samples. *Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 1:  
43-52

Waters C. M., Bassler B. L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in  
bacteria. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 21: 319-346

## **ZAHVALA**

Najlepša hvala mentorici doc. dr. Martini Turk za sprejetje mentorstva, za vso pomoč, nasvete in potrpežljivost pri laboratorijskem delu ter za strokovni pregled magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem recenzentu prof. dr. Blažu Stresu za hiter pregled magistrskega dela ter predsedniku komisije prof. dr. Gorazdu Avguštinu za hiter odziv in sodelovanje.

Hvala tehnični sodelavki Barbari Kastelic - Bokal, za vso pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu in dr. Cenetu Gostinčarju za izdelavo filogenetskega drevesa.

Posebna zahvala gre mojim staršem, za podporo, svetovanje, potrpežljivost, spodbujanje in nenazadnje tudi financiranje moje študijske poti.

Hvala tudi vsem mojim sošolcem, biologom in mikrobiologom, za vsa druženja, kavice, spodbudne besede, pomoč in napotke tekom celotnega študija. Z vami sem preživila nepozabne študentske dni.

## PRILOGE

Priloga A1: Seznam izoliranih sevov iz ledenika Grinnell in njihovo ocenjeno skupno število pri vseh temperaturah in gojiščih.

rod	vrsta	ocenjeno skupno število pri vseh T in gojiščih
<i>Arthrobacter</i>	<i>nitroguajacolicus</i>	3
<i>Arthrobacter</i>	<i>pascens</i>	1
<i>Arthrobacter</i>	<i>scleromae</i>	3
<i>Arthrobacter</i>	sp.	40
<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	15
<i>Caulobacter</i>	sp.	1
<i>Duganella</i>	sp.	580
<i>Exiguobacterium</i>	<i>antarcticum</i>	5
<i>Flavobacterium</i>	<i>glaciei</i>	150
<i>Flavobacterium</i>	sp.	1440
<i>Flavobacterium</i>	<i>xinjiangense</i>	55
<i>Janthinobacterium</i>	sp.	1670
<i>Massilia</i>	<i>aurea</i>	10
<i>Massilia</i>	sp.	23
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	1
<i>Mitsuaria</i>	<i>chitosanitabida</i>	35
<i>Pelomonas</i>	sp.	9
<i>Pseudomonas</i>	<i>antarctica</i>	10
<i>Pseudomonas</i>	<i>baetica</i>	320
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	<i>fragi</i>	2
<i>Pseudomonas</i>	<i>frederiksbergensis</i>	8
<i>Pseudomonas</i>	<i>mandelii</i>	27
<i>Pseudomonas</i>	<i>moorei</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	<i>orientalis</i>	3
<i>Pseudomonas</i>	sp.	570
<i>Pseudomonas</i>	<i>thivervalensis</i>	3
<i>Pseudomonas</i>	<i>trivialis</i>	2
<i>Rhodococcus</i>	sp.	1
<i>Rugamonas</i>	<i>rubra</i>	210

Priloga A2: Seznam izoliranih sevov iz ledenika Rhone in njihovo ocenjeno skupno število pri vseh temperaturah in gojičih.

rod	vrsta	ocenjeno skupno število pri vseh T in gojičih
<i>Albidiferax</i>	sp.	300
<i>Arthrobacter</i>	sp.	3
<i>Brevundimonas</i>	<i>vesicularis</i>	22
<i>Chryseobacterium</i>	<i>aquaticum</i>	40
<i>Chryseobacterium</i>	sp.	51
<i>Corynebacterium</i>	<i>mucifaciens</i>	1
<i>Epilithonimonas</i>	sp.	2
<i>Frondihabitans</i>	sp.	2
<i>Glaciimonas</i>	<i>immobilis</i>	105
<i>Glaciimonas</i>	sp.	5
<i>Janthinobacterium</i>	sp.	4800
<i>Massilia</i>	sp.	180
<i>Microbacterium</i>	sp.	4
<i>Moraxella</i>	sp.	5
<i>Mucilaginibacter</i>	sp.	16
<i>Noviherbspirillum</i>	<i>psychrotolerans</i>	4
<i>Pedobacter</i>	sp.	1
<i>Polaromonas</i>	sp.	1
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	320
<i>Pseudomonas</i>	<i>frederiksbergensis</i>	1480
<i>Pseudomonas</i>	<i>mandelii</i>	7
<i>Pseudomonas</i>	<i>psychrotolerans</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	sp.	130
<i>Pseudomonas</i>	<i>tolaasii</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	<i>veronii</i>	11
<i>Rhodoferax</i>	sp.	1
<i>Rugamonas</i>	<i>rubra</i>	5
<i>Sphingomonas</i>	<i>glacialis</i>	47
<i>Sphingomonas</i>	<i>panni</i>	1
<i>Sphingomonas</i>	sp.	52
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	1
<i>Stenotrophomonas</i>	sp.	11
<i>Subtercola</i>	sp.	3

Priloga B1: Testirani izolati iz ledenika Grinnell, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom. (oznaka vzorca glej 3.3)

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
1	L-1585	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
2	L-1603	<i>Arthrobacter scleromae</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
3	L-1625	<i>Arthrobacter</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
4	L-1582	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
5	L-1598	<i>Caulobacter</i> sp.	GL2	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
6	L-1405	<i>Duganella</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
7	L-1408	<i>Duganella</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
8	L-1581	<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	L-1592	<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	L-1432	<i>Flavobacterium glaciei</i>	GV	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11	L-1433	<i>Flavobacterium glaciei</i>	GV	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
12	L-1388	<i>Flavobacterium</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
13	L-1626	<i>Flavobacterium</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
14	L-1409	<i>Flavobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
15	L-1410	<i>Flavobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
16	L-1435	<i>Flavobacterium</i> sp.	GV	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
17	L-1436	<i>Flavobacterium</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	L-1434	<i>Flavobacterium</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
19	L-1437	<i>Flavobacterium</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
20	L-1411	<i>Flavobacterium xinjiangense</i>	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
21	L-1642	<i>Flavobacterium xinjiangense</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
22	L-1389	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
23	L-1412	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
24	L-1416	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
25	L-1413	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
26	L-1415	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
27	L-1392	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
28	L-1418	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
29	L-1420	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
30	L-1421	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B1: Testirani izolati iz ledenika Grinnell, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom.

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
31	L-1424	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
32	L-1425	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
33	L-1426	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
34	L-1427	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
35	L-1428	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
36	L-1419	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
37	L-1422	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
38	L-1423	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
39	L-1440	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
40	L-1394	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
41	L-1640	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
42	L-1639	<i>Janthinobacterium</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
43	L-1628	<i>Massilia aurea</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
44	L-1596	<i>Massilia aurea</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
45	L-1395	<i>Massilia</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
46	L-1638	<i>Massilia</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
47	L-1597	<i>Micrococcus luteus</i>	GL2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
48	L-1599	<i>Pelomonas</i> sp.	GL2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	L-1429	<i>Pseudomonas antarctica</i>	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
50	L-1602	<i>Pseudomonas antarctica</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
51	L-1396	<i>Pseudomonas baetica</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
52	L-1587	<i>Pseudomonas baetica</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
53	L-1397	<i>Pseudomonas baetica</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
54	L-1631	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
55	L-1630	<i>Pseudomonas fragi</i>	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
56	L-1637	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
57	L-1586	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
58	L-1444	<i>Pseudomonas mandelii</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
59	L-1633	<i>Pseudomonas mandelii</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
60	L-1445	<i>Pseudomonas mandelii</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
61	L-1601	<i>Pseudomonas moorei</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B1: Testirani izolati iz ledenika Grinnell, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom.

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
62	L-1398	<i>Pseudomonas orientalis</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
63	L-1399	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
64	L-1400	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
65	L-1401	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
66	L-1584	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
67	L-1593	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
68	L-1594	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
69	L-1643	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
70	L-1447	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
71	L-1448	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
72	L-1632	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
73	L-1446	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
74	L-1604	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
75	L-1402	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
76	L-1583	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
77	L-1590	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
78	L-1403	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
79	L-1629	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
80	L-1430	<i>Pseudomonas</i> sp.	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
81	L-1449	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
82	L-1451	<i>Pseudomonas</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
83	L-1404	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	GL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
84	L-1452	<i>Pseudomonas trivialis</i>	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
85	L-1600	<i>Rhodococcus</i> sp.	GV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
86	L-1641	<i>Rugamonas rubra</i>	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
87	L-1431	<i>Rugamonas rubra</i>	GL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

Priloga B2: Testirani izolati iz ledenika Rhone, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom. (oznaka vzorca glej 3.3)

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
1	L-1503	<i>Albidiferax</i> sp.	RL3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	L-1609	<i>Arthrobacter</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
3	L-1635	<i>Arthrobacter</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
4	L-1615	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Rzg	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
5	L-1624	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Rzg	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
6	L-1577	<i>Chryseobacterium aquaticum</i>	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
7	L-1475	<i>Comamonadaceae bacterium</i>	RL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
8	L-1607	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	RL2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
9	L-1554	<i>Frondihabitans</i> sp.	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
10	L-1453	<i>Glaciimonas immobilis</i>	RL1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
11	L-1478	<i>Glaciimonas immobilis</i>	RL2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
12	L-1502	<i>Glaciimonas immobilis</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
13	L-1528	<i>Glaciimonas immobilis</i>	Rsp	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
14	L-1529	<i>Glaciimonas immobilis</i>	Rsp	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
15	L-1649	<i>Glaciimonas</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
16	L-1654	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
17	L-1455	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
18	L-1457	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
19	L-1458	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
20	L-1454	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
21	L-1456	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
22	L-1504	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
23	L-1505	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
24	L-1506	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
25	L-1530	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
26	L-1531	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
27	L-1532	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
28	L-1533	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
29	L-1580	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
30	L-1579	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B2: Testirani izolati iz ledenika Rhone, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom.

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
31	L-1476	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
32	L-1462	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
33	L-1459	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
34	L-1460	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
35	L-1461	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
36	L-1511	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
37	L-1513	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
38	L-1508	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
39	L-1509	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
40	L-1510	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
41	L-1477	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
42	L-1479	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
43	L-1574	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
44	L-1463	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
45	L-1490	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
46	L-1491	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
47	L-1515	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
48	L-1516	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
49	L-1648	<i>Janthinobacterium</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
50	L-1534	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
51	L-1535	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
52	L-1645	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
53	L-1656	<i>Janthinobacterium</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
54	L-1559	<i>Massilia</i> sp.	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
55	L-1613	<i>Microbacterium</i> sp.	Rzg	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
56	L-1492	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	RL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
57	L-1519	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
58	L-1562	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
59	L-1646	<i>Pedobacter</i> sp.	RL2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
60	L-1465	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
61	L-1644	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B2: Testirani izolati iz ledenika Rhone, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom.

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
62	L-1467	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
63	L-1464	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
64	L-1466	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
65	L-1606	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
66	L-1608	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
67	L-1650	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
68	L-1546	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
69	L-1610	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
70	L-1468	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
71	L-1470	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
72	L-1469	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
73	L-1471	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
74	L-1493	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
75	L-1494	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
76	L-1521	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
77	L-1522	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
78	L-1520	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
79	L-1523	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
80	L-1524	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
81	L-1539	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
82	L-1540	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
83	L-1543	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
84	L-1541	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
85	L-1544	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
86	L-1545	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
87	L-1542	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
88	L-1537	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
89	L-1567	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
90	L-1568	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
91	L-1569	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
92	L-1570	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B2: Testirani izolati iz ledenika Rhone, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom.

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
93	L-1575	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
94	L-1487	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
95	L-1547	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
96	L-1495	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
97	L-1507	<i>Pseudomonas mandelii</i>	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
98	L-1618	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	Rzg	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
99	L-1472	<i>Pseudomonas</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
100	L-1634	<i>Pseudomonas</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
101	L-1605	<i>Pseudomonas</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
102	L-1525	<i>Pseudomonas</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
103	L-1651	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
104	L-1548	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
105	L-1538	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
106	L-1623	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
107	L-1473	<i>Pseudomonas</i> sp.	RL1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
108	L-1526	<i>Pseudomonas</i> sp.	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
109	L-1612	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
110	L-1527	<i>Pseudomonas veronii</i>	RL3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
111	L-1549	<i>Pseudomonas veronii</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
112	L-1550	<i>Pseudomonas veronii</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
113	L-1551	<i>Pseudomonas veronii</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
114	L-1552	<i>Pseudomonas veronii</i>	Rsp	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
115	L-1563	<i>Rugamonas rubra</i>	Rzg	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
116	L-1497	<i>Sphingomonas glacialis</i>	RL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
117	L-1571	<i>Sphingomonas glacialis</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
118	L-1572	<i>Sphingomonas glacialis</i>	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
119	L-1619	<i>Sphingomonas panni</i>	Rzg	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
120	L-1498	<i>Sphingomonas</i> sp.	RL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
121	L-1573	<i>Sphingomonas</i> sp.	RV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
122	L-1617	<i>Sphingomonas</i> sp.	Rzg	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
123	L-1566	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Rzg	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B2: Testirani izolati iz ledenika Rhone, njihov temperaturni razpon rasti in odpornost proti izbranim antibiotikom.

	oznaka seva	vrsta	vzorec	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	Amp 50	Tc 15	Imp 2	Ert 0,5	Er 15	Ch 25	Kn 20	Cip 0,25	Ctx 2
124	L-1621	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Rzg	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
125	L-1576	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
126	L-1620	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Rzg	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
127	L-1647	<i>Subtercola</i> sp.	RL2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
128	L-1652	<i>Sphingomonas</i> sp.	RV	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
129	L-1564	<i>Undibacterium</i> sp.	RV	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
130	L-1501	<i>Xylophilus</i> sp.	RL2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-